

# Untersuchung der Substratspezifität der tRNA-Guanin-Transglykosylase (TGT) aus Eukaryoten und Prokaryoten und Charakterisierung der eukaryotischen TGT

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Inna Biela geb. Schmidt**

aus

Toparski / Karaganda

Marburg/Lahn 2013

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden auf Anregung von Herrn Prof. Dr. Klaus Reuter und Herrn Prof. Dr. Gerhard Klebe am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg in der Zeit von November 2009 bis Februar 2013 durchgeführt.

---

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 28.01.2014  
angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Klaus Reuter

Zweitgutachter: Prof. Dr. Gerhard Klebe

Tag der mündlichen Prüfung am 29.01.2014



## Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström ( $1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$ )
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
Da	Dalton
dest.	destilliert
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
h	Stunden
mQTRTD1v1	Queuin tRNA-Ribosyltransferase mit einer Protein-1 Domäne Isoform 1 aus der Maus
HABA	2-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hQTRTD1	Queuin tRNA-Ribosyltransferase mit einer Protein-1 Domäne aus dem Menschen
hQTRT1	tRNA-Guanin Transglykosylase (aktive Untereinheit) aus dem Menschen
ipa	invasion plasmid antigen
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
$K_i$	Inhibitionskonstante
$K_m$	Michaelis-Konstante
L	Liter
LB	Luria Bertani
M	molar (mol/L)
min	Minute
mRNA	messenger Ribonucleinsäure



mQTRT1	tRNA-Guanin Transglykosylase (aktive Untereinheit) aus der Maus
mxi	membrane expression of invasion plasmid antigens
OD <sub>λ</sub>	Optische Dichte bei λ nm
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PDB	Proteindatenbank
preQ <sub>1</sub>	7-Aminomethyl-7-deazaguanin
Queuin	7-Dihydroxycyclopentenylaminomthyl-7-deazaguanin
QTRTD1	Queuin tRNA-Ribosyltransferase enthaltenden Protein-1 Domäne
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
spa	surface presentation of invasion plasmid antigens
Stx	Shigella-Toxin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TGT	tRNA-Guanin Transglykosylase
TIM-barrel	Triose-phosphat Isomerase (TIM) / (β <sub>α</sub> ) <sub>8</sub> Fass
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonucleinsäure
UV	Ultraviolett
w/v	Masse/Gesamtvolumen

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>4</b>
<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>6</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>10</b>
<u>1.1</u> Die Shigellenruhr.....	10
<u>1.2</u> Krankheitsverlauf und Behandlung.....	10
<u>1.3</u> Shigellen.....	11
<u>1.4</u> Zelluläre und molekulare Pathogenese der Shigellenruhr.....	12
<u>1.5</u> Die Rolle der tRNA-Guanin-Transglykosylase bei der Shigellenpathogenität.....	14
<u>1.6</u> Funktion der tRNA-Guanin-Transglykosylase.....	16
<u>1.7</u> Inhibition der tRNA-Guanin-Transglykosylase.....	17
<u>1.8</u> Aufbau der bakteriellen tRNA-Guanin-Transglykosylase .....	18
<u>1.9</u> Die eukaryotische tRNA-Guanin-Transglykosylase.....	20
<u>1.10</u> Die physiologische Rolle von Queuin in Säugetieren und im Menschen.....	22
<u>1.11</u> Zielsetzung dieser Arbeit.....	22
<b>2 Substrate Specificity in tRNA-Guanine Transglycosylase.....</b>	<b>24</b>
<u>2.1</u> Abstract .....	24
<u>2.2</u> Intoduction.....	25
<u>2.3</u> Results.....	30
<u>2.3.1</u> Generation of an in silico homology model of the human Tgt catalytic subunit.....	30
<u>2.3.2</u> Point mutations aimed at enabling <i>Z. mobilis</i> Tgt to bind Q and kinetic characterization of the mutated variants.....	32
<u>2.3.3</u> Affinity of tRNA <sup>Tyr</sup> to Tgt as determined by microscale thermophoresis.....	34
<u>2.3.4</u> Inhibition of Tgt and its mutated variants by Q.....	35
<u>2.3.5</u> Crystal structure analyses of “wild type” Tgt and its mutated variants.....	38
<u>2.4</u> Discussion.....	45
<u>2.5</u> Materials and methods.....	51
<u>2.5.1</u> Homology modeling.....	51
<u>2.5.2</u> Cloning and Tgt preparation.....	51
<u>2.5.3</u> Preparation of Escherichia coli tRNA <sup>Tyr</sup> .....	52
<u>2.5.4</u> Preparation of preQ <sub>1</sub> and Q.....	52
<u>2.5.5</u> Determination of kinetic parameters.....	52
<u>2.5.6</u> Determination of inhibition constants.....	53
<u>2.5.7</u> SDS-PAGE trapping experiment.....	53
<u>2.5.8</u> Microscale thermophoresis measurements.....	54
<u>2.5.9</u> Crysatlisation, data collection, and processing.....	55
<u>2.5.10</u> Alignment and Figures.....	57
<u>2.5.11</u> Protein Data Bank Accession Codes.....	57

2.5.12 Crystallographic Tables.....	58
2.5.13 Acknowledgements.....	61
2.5.14 Funding.....	61
2.6 References.....	62
<b>3 Charakterisierung der katalytischen Untereinheit der eukaryotischen TGT (QTRT1), der nicht-katalytischen Untereinheit (QTRTD1) und des korrespondierenden Heterodimers.....</b>	<b>68</b>
3.1 Ergebnisse und Diskussion.....	68
3.1.1 Konstruktion rekombinanter Expressionssysteme für die Gene der TGT- Untereinheit aus Maus und Mensch.....	68
3.1.2 Überproduktion, Aufreinigung und Charakterisierung der katalytischen Untereinheit der TGT aus der Maus (mQTRT1) und dem Menschen (hQTRT1).....	71
3.1.2.1 Überproduktion und Aufreinigung der QTRT1 aus Maus und Mensch...	71
3.1.2.2 ESI-MS und HPLC-MS zur Untersuchung der Reinheit und Identität dem mQTRT1 und hQTRT1.....	76
3.1.2.3 Untersuchung der Quartärstruktur der isolierten mQTRT1 bzw. hQTRT1 mittels NanoESI-MS unter nativen Bedingungen.....	79
3.1.2.4 Ermittlung der Enzymaktivität der mQTRT1 und hQTRT1.....	81
3.1.2.5 Untersuchung der Substratbindung durch die mQTRT1.....	81
3.1.2.6 Untersuchung der Dispersität von mQTRT1-Lösung mittels DLS (Dynamische Lichtstreuung).....	83
3.1.2.7 Untersuchung der Stabilität der mQTRT1 mit Hilfe des Thermal Shift Assays.....	84
3.1.2.8 Kristallisationsversuche mit der mQTRT1.....	89
3.1.3 Überproduktion, Aufreinigung und Charakterisierung der Queuin-tRNA- Ribosyltransferase mit einer Protein-1 Domäne (Isoform 1) aus der Maus (mQTRTD1v1) (nicht-katalytische Untereinheit).....	92
3.1.3.1 Überproduktion und Aufreinigung der mQTRTD1v1.....	92
3.1.3.2 ESI-MS und HPLC-MS zur Untersuchung der Reinheit und Identität der mQTRTD1v1.....	94
3.1.3.3 Untersuchung der Quartärstruktur der isolierten mQTRTD1v1 mittels NanoESI-MS unter nativen Bedingungen.....	96
3.1.3.4 Ermittlung der Enzymaktivität der mQTRTD1v1.....	98
3.1.3.5 Untersuchung der Substratbindung durch die mQTRTD1v1.....	98
3.1.3.6 Untersuchung der mQTRTD1v1 mittels DLS.....	99
3.1.3.7 Stabilitätsuntersuchungen an der mQTRTD1v1 mit Hilfe des Thermal Shift Assays.....	100
3.1.3.8 Kristallisationsstudien mit der mQTRTD1v1.....	102
3.1.3.9 Strukturaufklärung der mQTRTD1v1.....	107
3.1.3.10 Gesamt- und Tertiärstruktur der mQTRTD1v1.....	110
3.1.4 Charakterisierung des TGT-Heterodimers aus der Maus bestehend aus QTRT1- und QTRTD1v1-Untereinheit.....	113

<u>3.1.4.1</u> Kinetik und Stöchiometrie der Quartärstruktur der Maus-TGT mittels NanoESI-MS.....	114
<u>3.1.4.2</u> Untersuchung der tRNA <sup>Tyr</sup> -Bindung an das TGT-Heterodimer.....	116
<u>3.1.4.3</u> Kinetik der QTRTD1v1/QTRT1-tRNA-Komplex-Bildung.....	118
<u>3.1.4.4</u> Einfluss der Ionenstärke auf die Stabilität des QTRT1/QTRTD1v1-tRNA-Komplexes .....	120
<u>3.1.4.5</u> Kinetische Charakterisierung des TGT-Heterodimers.....	121
<u>3.1.4.6</u> Bestimmung der Dissoziationskonstante des QTRT1/QTRTD1v1-Komplexes mittels Thermophorese.....	124
<u>3.1.4.7</u> Untersuchungen der Dispersität einer mQTRT1/mQTRTD1v1-Heterodimer-Lösung mittels DLS.....	124
<u>3.1.4.8</u> Kristallisationsversuche mit der mQTRT/mQTRTD1v1-Heterodimer.....	125
<u>3.2</u> Materialien.....	128
<u>3.2.1</u> Chemikalien.....	128
<u>3.2.2</u> Geräte.....	129
<u>3.2.3</u> Puffer und Lösungen.....	130
<u>3.2.4</u> Medien.....	131
<u>3.2.5</u> Bakterienstämme.....	132
<u>3.2.6</u> Plasmide.....	133
<u>3.3</u> Methoden.....	133
<u>3.3.1</u> Klonierungstechnik.....	133
<u>3.3.1.1</u> Transformation.....	133
<u>3.3.1.2</u> Plasmidpräparation.....	134
<u>3.3.1.3</u> DNA-Sequenzierung.....	134
<u>3.3.1.4</u> Glycerinstocks.....	134
<u>3.3.2</u> Rekombinante Produktion und Aufreinigung der Queuin-tRNA Ribosyltransferase 1 aus dem Menschen (hQTRT1) und der Maus (mQTRT1).....	135
<u>3.3.2.1</u> Rekombinante Produktion der hQTRT1 und m QTRT1 in <i>E. coli</i> .....	135
<u>3.3.2.2</u> Zellyse und Herstellung eines hQTRT1- bzw. mQTRT1-haltigen Rohextrakts.....	135
<u>3.3.2.3</u> Aufreinigung der rekombinanten hQTRT1 bzw. mQTRT1 mittels Säulenchromatographie.....	136
<u>3.3.2.4</u> Entfernung des Streptag® II vom Zielprotein mittels Thrombin.....	136
<u>3.3.3</u> Rekombinante Produktion und Aufreinigung der Queuin-tRNA Ribosyltransferase mit einer Protein-1 Domäne (QTRTD1) aus dem Menschen und der Maus (Isoform 1).....	137
<u>3.3.3.1</u> Rekombinante Produktion der hQTRTD1 und mQTRTD1 in <i>E. coli</i> .....	137
<u>3.3.3.2</u> Zellyse und Herstellung eines hQTRTD1- bzw. mQTRTD1-haltigen Rohextrakts.....	137
<u>3.3.3.3</u> Aufreinigung der rekombinanten hQTRTD1 bzw. mQTRTD1 mittels Säulenchromatographie.....	137
<u>3.3.3.4</u> Entfernung des Streptag® II durch Thrombin.....	138

<u>3.3.4</u> SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	138
<u>3.3.5</u> Konzentrationsbestimmung von DNA-, <i>E. coli</i> tRNA <sup>Tyr</sup> - und Proteinen Lösungen.....	139
<u>3.3.5.1</u> Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen.....	139
<u>3.3.5.2</u> Konzentrationsbestimmung von <i>E. coli</i> tRNA <sup>Tyr</sup> -Lösungen.....	140
<u>3.3.5.3</u> Konzentrationsbestimmung von Proteinen-Lösungen.....	140
<u>3.3.6</u> Präparation und Reinigung des Plasmid ptRNA2.....	141
<u>3.3.7</u> Präparation und Reinigung von nicht modifizierter <i>E.coli</i> tRNA <sup>Tyr</sup> .....	141
<u>3.3.8</u> Bestimmung von kinetischen Parametern der QTRT1 und QTRTD1 (Enzymassay).....	141
<u>3.3.9</u> Bestimmung von Inhibitionskonstanten.....	143
<u>3.3.10</u> Thermophorese.....	145
<u>3.3.11</u> Dynamische Lichtstreuemessungen (DLS).....	146
<u>3.3.12</u> HPLC-MS Experimente.....	147
<u>3.3.13</u> Thermal Shift Assay.....	147
<u>3.3.14</u> ESI-MS Experimente unter nativen Bedingungen.....	147
<u>3.3.15</u> Kristallisation/ <i>Screening</i> .....	147
<u>3.3.16</u> Kristallisation QTRTD1v1 der Maus.....	149
<u>3.3.17</u> Röntgenstrukturanalyse und Strukturlösung QTRTD1v1 der Maus.....	149
<u>3.4</u> Anhang.....	151
<u>3.5</u> Literaturverzeichnis .....	167
<b>4 Zusammenfassung / Summary</b> .....	172
<b>Publikationen</b> .....	176
<b>Danksagung</b> .....	177
<b>Eidesstattliche Erklärung</b> .....	179
<b>Lebenslauf</b> .....	180

# **1 Einleitung**

## **1.1 Die Shigellenruhr**

Die Shigellenruhr oder Shigellose ist eine meldepflichtige durch die Bakteriengattung *Shigella* verursachte schwerwiegende blutige Durchfallerkrankung (Diarrhoe), die im schlimmsten Fall tödliche Folgen haben kann. Insbesondere bei Kleinkindern und Senioren kann ein Durchfall ohne eine medikamentöse Therapie zum Verlust großer Flüssigkeits- und Elektrolytmengen (Dehydratation) führen und somit einen schweren Krankheitsverlauf annehmen. Deshalb ist bei diesen Personengruppen der Ersatz verloren gegangener Flüssigkeit und Elektrolyte zwingend notwendig. Ein sehr guter Hygienestandard sowie der Einsatz von Antibiotika haben dazu beigetragen, dass heutzutage in den Industrieländern kaum noch ein Patient der Shigellose erliegt. Dennoch wird auch in den Ländern der ersten Welt von etwa 1,5 Millionen Infektionsfällen mit der Shigellenruhr jährlich berichtet. Weit dramatischer stellt sich die Situation in Entwicklungsländern dar. Hier werden jährlich 170 Millionen Erkrankte registriert, wovon etwa 1,7 bis 2 Millionen Fälle tödlich verlaufen. Bei 60 % der Betroffenen handelt es sich um Kinder unter 5 Jahren [WHO, 2005]. Die Gründe für solch einen katastrophalen Krankheitsverlauf sind vor allem schlechte Hygienemaßnahmen, das Zusammenleben auf engstem Raum, Unterversorgung mit sauberem Wasser, Naturkatastrophen und nicht zu zuletzt Krieg. Aber nicht nur schlechte Lebensbedingungen, sondern auch die immer häufiger auftretenden Resistenzen der Erreger gegenüber der konventionellen Antibiotikatherapie lassen die Shigellenruhr grassieren. Um das Ausmaß von Shigelleninfektionen eindämmen zu können, ist die Entwicklung neuer und spezifischer Arzneimittel dringendst geboten [WHO, 2005; 2009]. Bei der Arzneimittelentwicklung darf das Augenmerk aber nicht nur auf das Zielprotein gerichtet sein, sondern muss auf verwandte, ähnliche Proteine im menschlichen Organismus erweitert werden, um einen Therapieverlauf ohne ernsthafte Nebenwirkungen zu gewährleisten.

## **1.2 Krankheitsverlauf und Behandlung**

Bei Shigellen handelt es sich um extrem ansteckende Mikroorganismen, denn bereits 10 bis 100 Keime können bei einem Erwachsenen zu einer Infektion führen. Übertragen werden Shigellen fäkal-oral durch Schmierinfektion oder über kontaminierte Lebensmittel [DuPont

et al., 1998]. Im sauren Milieu des Magens überlebt der Erreger leicht und gelangt danach über den Dünndarm in den Dickdarm. Dort angekommen dringt er in die Darmepithelzellen ein und vermehrt sich explosionsartig [Purdy et al., 2002]. Zunächst führt die damit einhergehende starke Zerstörung des Darmepithels, die die Wasseraufnahme des Darms vermindert, zum heftigen Durchfall [Kadurugamuwa et al., 1991]. In leichten Fällen der Shigellenruhr bleiben die Symptome auf dyseptische Beschwerden, Fieber und Durchfall beschränkt, wobei die Infektion innerhalb von ein bis zwei Wochen ausheilt [WHO, 2005]. In schweren Fällen treten darüber hinaus Nekrosen, Geschwürbildungen, Schleimhautblutungen und sogar Perforationen im Dickdarmbereich auf, die unbehandelt zum Tod führen können. Bei einer Infektion mit *S. dysenteriae* (auch "Shiga-Bacillus" genannt) kommt es durch die Produktion eines potenten Zytotoxins zu weiteren Komplikationen im Krankheitsverlauf, die sich in einem hämolytisch urämischem Syndrom äußern [O'Loughlin & Robins-Browne, 2001]. Durch Gabe von Antibiotika kann der Krankheitsverlauf gemindert und verkürzt werden. Geeignet für eine Antibiotikatherapie ist in erster Linie Ciprofloxacin, welches preiswert ist und von allen Altersgruppen gut vertragen wird. Leider neigen Shigellen, die mit den *Escherichia coli*-Bakterien der Darmflora nahe verwandt sind, zu einer schnellen Resistenzbildung gegen Antibiotika. Bei Ciprofloxacin-resistenten *Shigella*-Stämmen müssen Pivmesilliname, Ceftriaxone oder Azithromycin eingesetzt werden, die vergleichsweise teuer sind und zu schweren Nebenwirkungen führen können. Eine Antibiotikatherapie tötet neben den Shigellen auch die Bakterien der eigenen natürlichen Darmflora ab, was sogar zu einer Verschlimmerung des Durchfalls und des damit einhergehenden Flüssigkeitsverlusts führen kann. Ein selektiver Therapieansatz, bei dem lediglich die Pathogenitätsentwicklung der Shigellen unterdrückt wird, wäre folglich wünschenswert.

### 1.3 Shigellen

Shigellen gehören zu der Familie der *Enterobacteriaceae*. Sie sind gramnegative, unbewegliche, unbegeißelte, fakultativ anaerobe Stäbchen, die eine taxonomisch pathogene Variante des Darmbakteriums *Escherichia coli* darstellen [Hale, 1998]. Benannt wurden sie nach dem japanischen Bakteriologen Kiyoshi Shiga, dem Entdecker des Erregers der Bakterienruhr.

Die Gattung *Shigella* besteht aus vier Species:

- *S. dysenteriae* (Serogruppe A mit 16 Serotypen)
- *S. flexneri* (Serogruppe B mit 6 Serotypen darunter 15 Subtypen)
- *S. boydii* (Serogruppe C mit 18 Serotypen)
- *S. sonnei* (Serogruppe D mit 1 Serotyp)

*S. sonnei* und *S. boydii* führen zu einem relativ milden Krankheitsverlauf der Shigellenruhr, wobei die zuletzt genannte Art vorwiegend in den Industrieländern vorkommt. *S. flexneri* tritt dagegen weltweit auf. *S. dysenteriae* führt über sich schnell ausbreitenden Epidemien zu äußerst schweren Infektionen, die durch eine hohe Mortalität gekennzeichnet sind. Zu dem durch "Shiga-Bacillus" verursachten Durchfall kommt es zusätzlich zu verschiedenen Komplikationen wie Gehirn- und Nierenschäden, welche durch die Produktion eines potenten Zytotoxins ausgelöst werden [O'Loughlin & Robins-Browne, 2001].

## 1.4 Zelluläre und molekulare Pathogenese der Shigellenruhr

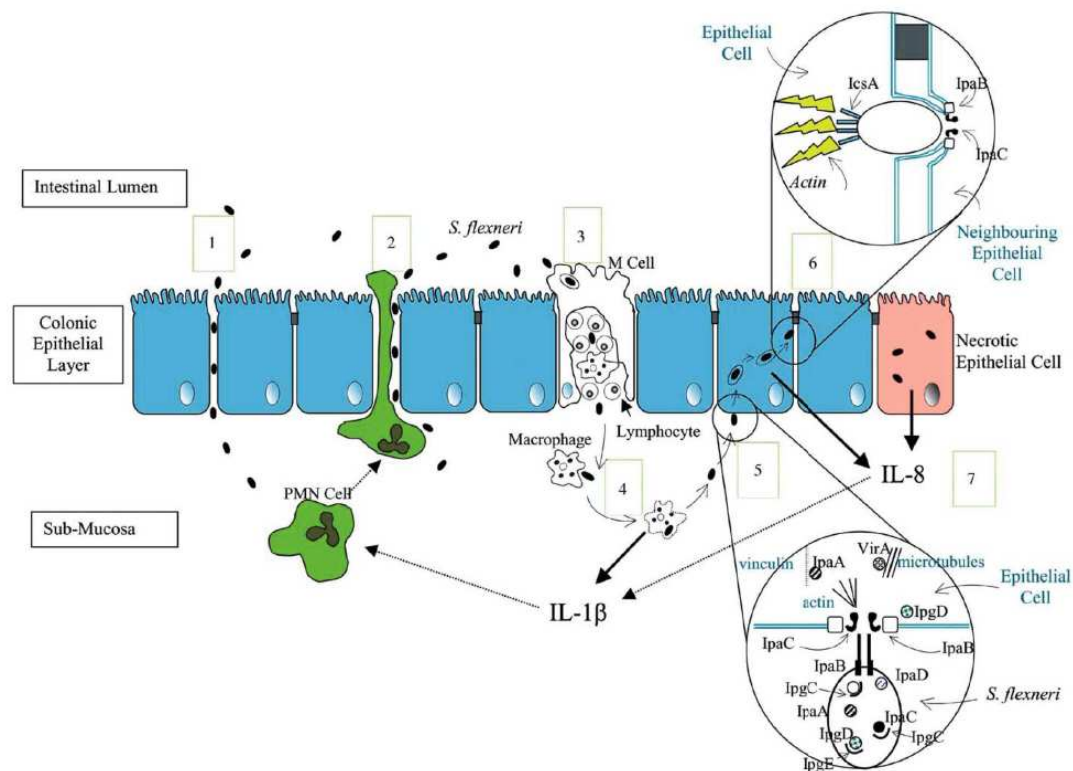
Für die Epithelzellinvasion und die intra- und interzelluläre Kolonisation durch Shigellen sind eine Reihe von Virulenzfaktoren verantwortlich (Abb. 1). Shigellen sind nicht in der Lage, von der apikalen Seite des Dickdarms in Epithelzellen einzudringen, weshalb sie zunächst die Barriere der Darmschleimhaut überwinden müssen. Das Durchwandern der Darmschleimhaut kann dabei über drei verschiedene Wege erfolgen [Sansonetti, 1991; Jennison & Naresh, 2004]:

1. über die "dichten Haftverbindungen" (Tight Junctions) der Epithelzellen
2. über neutrophile Granulozyten
3. über die M-Zellen durch Transzytose

Nach der Passage der M-Zellen treffen die Shigellen zunächst auf residente Makrophagen. Nach Phagozytose durch einen Makrophagen entkommt der Erreger durch Auflösen der Membran dem Phagosom und gelangt in das Makrophagenzytoplasma. Durch die Sezernierung von bakteriellem IpaB, welches das Interleukin-1 $\beta$  converting enzyme (Ice = oder Caspase-1) aktiviert, erfolgt die Einleitung der Apoptose des Makrophagen. Ice überführt die proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 in ihre aktive Form, was eine heftige Entzündungsantwort des Darmepithels induziert. Als Folge werden zusätzlich chemotaktische Granulozyten rekrutiert [Jennison & Naresh 2004]. Diese wiederum



wandern durch das Darmepithel zum Infektionsherd, führen dabei zur Öffnung von "Dichten Haftverbindungen" und erleichtern so das Eindringen zusätzlicher Shigellen auf die basolaterale Seite des Darmepithels. Nach Apoptose der Makrophagen gelangen die Shigellen in die Submucosa, von wo sie in das Darmepithel über dessen basolaterale Seite eindringen können. Der Invasionsprozess der Bakterien in die Darmepithelzellen wird durch das Binden des bakteriellen Typ III-Sekretionsapparats an die Membran der Wirtszelle eingeleitet. Es erfolgt die Sekretion der Invasine IpaB und IpaC, die zusammen in der Wirtszellmembran eine 25 Å große Pore bilden, durch die weitere Pathogenitätsfaktoren in das Wirtszellzytoplasma transportiert werden. IpaC löst darüber hinaus die Polymerisation von Actin aus, was zu einer massiven Zytoskelettumlagerung in der Wirtszelle führt. Dabei wird der Erreger in einem makropinozytotischen Prozess über eine blütenförmige Eintrittsstruktur in die Wirtszelle internalisiert [Sansonetti, 2001]. Das Bakterium befindet sich zunächst in einer phagosomalen Vakuole, die jedoch rasch lysiert wird, sodass es frei im Wirtszytoplasma vorliegt [Bourdet-Sicard et al., 1999]. Die Bakterien bewegen sich nun mittels eines Prozesses, der ebenfalls die Polymerisation von Actin involviert, durch das Zytoplasma vorwärts. Für diesen Vorgang ist das zelloberflächenexponierte IscA- (VirG-) Protein notwendig. Gelangt der Erreger an die Zellmembran einer Nachbarzelle, kommt es zu einer röhrenförmigen Vorstülpung in die benachbarte Epithelzelle, durch die das Bakterium in die Nachbarzelle aufgenommen werden kann. Die Membrandoppelschicht, von der die Vorstülpung umgeben ist, wird durch IpaB und IpaC lysiert. Auf diese Weise können sich die Shigellen von Zelle zu Zelle ausbreiten und unbemerkt vom Immunsystem vermehren [Zychlinsky & Sansonetti, 1997].



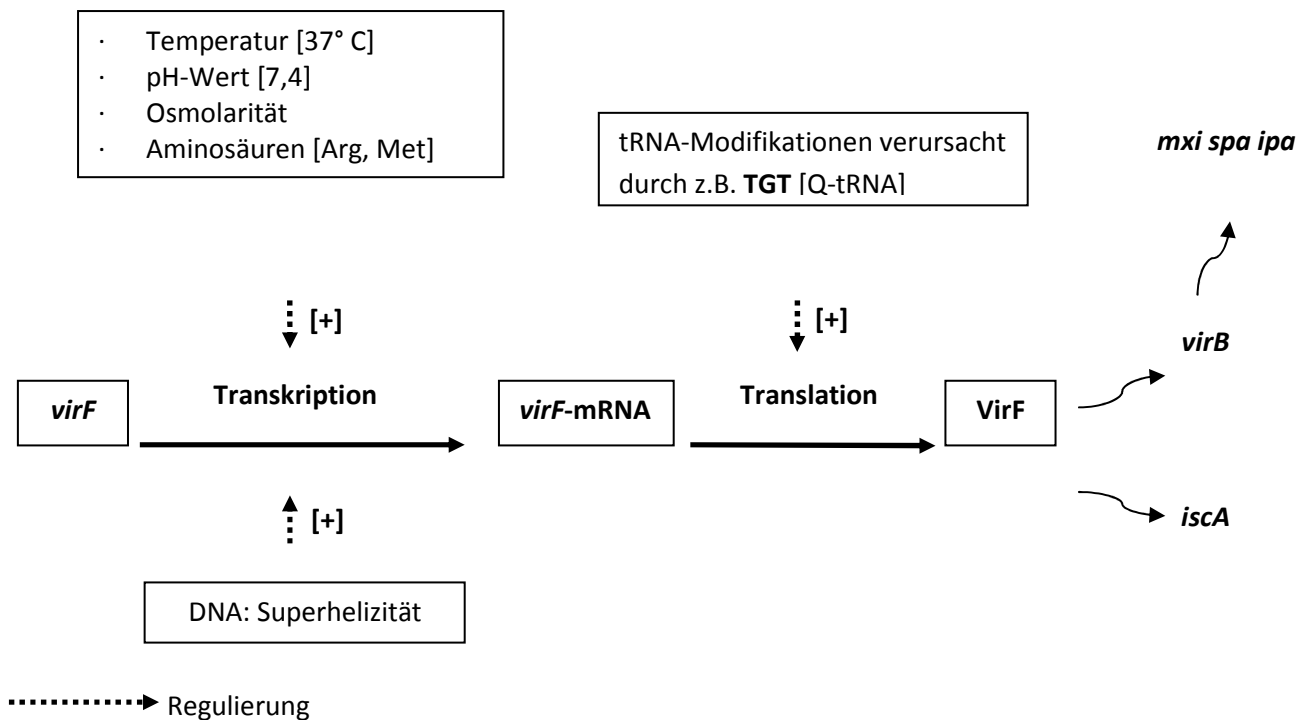
**Abbildung 1:** Zelluläre Pathogenese von *S. flexneri*:

(1) Invasion von *S. flexneri* über "Dichte Haftverbindungen" (*Tight Junctions*) der Epithelzellen oder über (2) neutrophile Granulozyten oder (3) M-Zellen mittels Transzytose. (4) Aufnahme durch Makrophagen und (5) Infizierung des Epithels von der basolateralen Seite nach Freisetzung durch Auslösung der Apoptose der Makrophagen. (6) Infizierung von Nachbarzellen. (7) Infizierte Zellen sezernieren IL-8, das zusammen mit IL-1 $\beta$  chemotaktische Granulozyten rekrutiert. Abbildung aus Jennison et al. [2004].

## 1.5 Die Rolle der tRNA-Guanin-Transglykosylase bei der Shigellenpathogenität

Wie bereits in Abschnitt 1.4 erwähnt, ist für die Epithelzellinvasion sowie für die intra- und interzelluläre Ausbreitung der Shigellen eine Reihe von Virulenzfaktoren verantwortlich. Die dafür kodierenden Gene sind auf einem großen, 214 kbp umfassenden Virulenzplasmid lokalisiert, dessen Variante aus *S. flexneri* bereits vollständig sequenziert wurde. Die Transkriptionsaktivatoren VirF und VirB nehmen bei der Expression der Gene, deren Produkte in einer frühen Phase des Infektionszyklus benötigt werden, eine Schlüsselfunktion ein (Abb. 2) [Dorman & Porter, 1998]. VirF aktiviert zunächst die Transkription der Gene für den Transkriptionsfaktor VirB und für das IcsA-Protein. IcsA ist, wie bereits erwähnt, an der intra- und interzellulären Ausbreitung der Shigellen beteiligt. VirB dient wiederum als

Transkriptionsaktivator der *mxi-/spa*- und *ipa*-Gene. Die *mxi-/spa*-Genprodukte stellen die Komponenten des Typ III-Sekretionssystems dar, welches die Sekretion von Pathogenitätsfaktoren in die Wirtszelle vermittelt [Parsot et al., 2000]. Die *ipa*-Gene kodieren für sogenannte Invasine, welche für das Eindringen der Bakterien in die Wirtszelle erforderlich sind. Es scheint, dass VirF eine übergeordnete Rolle bei der Regulation der Shigellen-Pathogenität einnimmt, da die Bakterien unterhalb einer bestimmten Schwellenkonzentration von VirF weitgehend ihre Pathogenität verlieren [Durand et al., 2000]. Entscheidend für die Produktion von VirF sind Umweltfaktoren wie Temperatur, Osmolarität, pH-Wert sowie die Verfügbarkeit bestimmter freier Aminosäuren (v. a. von Arginin und Methionin). Aber auch die Superhelizität der DNA sowie modifizierte tRNA regulieren die Expression des *virF*-Gens [Dorman & Porter, 1998; Durand & Björk, 2003]. Offensichtlich ist es entscheidend, dass bestimmte tRNAs die hypermodifizierte Base Queuin in der Wobble-Position 34 sowie das 2-Methylthio-N<sup>6</sup>-isopentenyladenosin (ms<sup>2</sup>i<sup>6</sup>A37) an Position 37 benachbart zum 3'-Ende des Anticodons enthalten. Fehlen diese tRNA-Modifikationen, findet eine ineffiziente Translation der *virF*-mRNA statt, was dazu führt, dass die VirF-Konzentration unterhalb des kritischen Schwellenwerts bleibt. Als Folge produzieren die Shigellen dann kaum die für den Befall der Endothelzellen notwendigen Virulenzfaktoren. Demnach eignen sich Enzyme, die an der Biosynthese der beiden modifizierten Basen beteiligt sind, als potenzielle Angriffspunkte für eine Shigellen-spezifische Therapie. Mutationsstudien an *S. flexneri* zeigten, dass Defekte im *miaA*-Gen (beteiligt an der Biosynthese von ms<sup>2</sup>i<sup>6</sup>A37) oder *tgt*-Gen (beteiligt an der Biosynthese von Queuin) im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich verminderte Virulenz zur Folge haben [Durand et al., 1994, 1997]. *E. coli*-Bakterien mit einem Defekt im *miaA*-Gen zeigen im Vergleich zum Wildtyp ein deutlich verlangsamtes Wachstum [Diaz et al., 1987], wogegen ein Defekt im *tgt*-Gen keinen messbaren Einfluss auf das Wachstum von *E. coli* hat [Noguchi et al., 1982]. Folglich ist davon auszugehen, dass Inhibitoren der tRNA-Guanin-Transglykosylase (Tgt) kaum eine schädliche Wirkung auf die natürliche Darmflora des Menschen ausüben, was sich positiv auf die Verträglichkeit und Compliance einer entsprechenden Therapie auswirken sollte.



**Abbildung 2:** Regulation der *virF*-Expression.

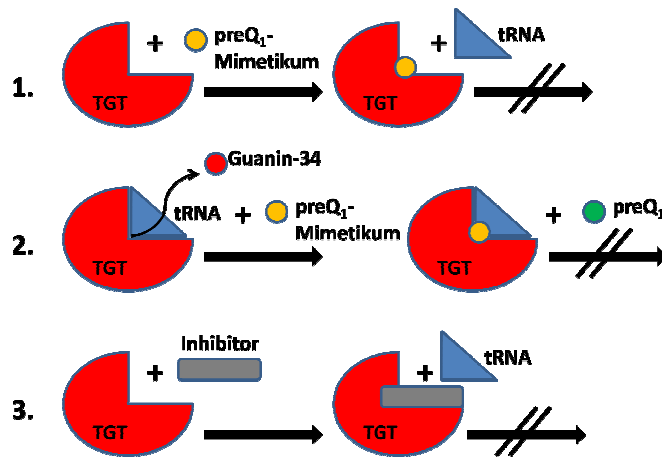
## 1.6 Funktion der tRNA-Guanin-Transglykosylase

Die tRNA-Guanin-Transglykosylase (TGT, QTRT1, EC 2.4.2.29) kommt in allen drei Domänen des Lebens vor und ist an der posttranskriptionalen Modifikation von tRNAs beteiligt. Das Enzym katalysiert den positionsspezifischen Austausch eines Guanins in bestimmten tRNAs durch ein 7-substituiertes 7-Deazaguanin-Derivat [Stengl et al., 2005]. Die Spezifität des Enzyms bezüglich des tRNA-Substrats, des zu inserierenden 7-Deazaguanins und der Position des Guanins innerhalb der tRNA unterscheidet sich jedoch je nach Domäne des Lebens. So ersetzt die archaebakterielle TGT Guanin an Position 15 gegen die prämodifizierte Base preQ<sub>0</sub>, die in weiteren Reaktionen vollständig zu Archaeosin modifiziert wird [Watanabe et al., 1997]. Sowohl die bakterielle als auch die eukaryotische TGT sind an der Biosynthese des hypermodifizierten tRNA-Nukleosids Queuosin an Position 34 (der „wobble“-Position) von His-, Tyr-, Asp- und Asn-spezifischen tRNAs, denen die Anticodonsequenz G<sub>34</sub>U<sub>35</sub>N<sub>36</sub> gemeinsam ist, beteiligt [Kasai et al., 1975]. Die beiden TGT-Varianten unterscheiden sich jedoch in ihrer Basensubstratspezifität. Die bakterielle TGT tauscht Guanin-34 gegen die prämodifizierte Base preQ<sub>1</sub> aus, die im Anschluss durch die S-Adenosylmethionin:tRNA-Ribosyltransferase-Isomerase (QueA) und die Coenzym B<sub>12</sub> abhängige Epoxyqueuosin-Reduktase (QueG) auf tRNA-Ebene zu Queuin modifiziert wird. Die eukaryotische TGT

tauscht hingegen die Base Guanin direkt gegen Queuin aus, denn Eukaryoten sind nicht in der Lage, Queuin *de novo* zu synthetisieren. Die Basenaustauschreaktion der *Zymomonas mobilis* TGT ist durch biochemische Untersuchungen und eine Vielzahl hochaufgelöster Kristallstrukturen sehr gut charakterisiert. Zunächst bindet das tRNA-Substrat an die TGT, woraufhin die glycosidische Bindung von Guanosin an Position 34 gespalten wird. Dies hat die Ausbildung eines kovalenten TGT·tRNA-Komplexes zur Folge. Nachdem Guanin die Bindetasche verlassen hat, wird es durch preQ<sub>1</sub> ersetzt. Nach Ausbildung der neuen glycosidischen Bindung, verlässt die mit preQ<sub>1</sub> modifizierte tRNA das Enzym (für weitere Details siehe Kapitel 2.1).

## 1.7 Inhibition der tRNA-Guanin Transglykosylase

Der zweistufige katalytische Mechanismus der bakteriellen TGT erlaubt mehrere Möglichkeiten der Blockade durch Inhibitoren. Kleinere Inhibitoren, so genannte preQ<sub>1</sub>-Mimetika, können zunächst in die Guanin/preQ<sub>1</sub>-Bindestelle des apo-Proteins binden, was ein gleichzeitiges Binden der Substrat-tRNA verhindert. Sie wirken somit als kompetitive Inhibitoren bezüglich der tRNA. Darüber hinaus können sie die Guanin/preQ<sub>1</sub>-Bindestelle aber auch besetzen, nachdem die tRNA gebunden hat und das ursprüngliche Guanin an Position 34 durch Spalten der glycosidischen Bindung entfernt worden ist. Dies verhindert das Binden von preQ<sub>1</sub>, was ein Weiterreagieren des kovalenten TGT·tRNA-Komplexes unmöglich macht. In diesem Fall fungieren sie als unkompetitive Inhibitoren bezüglich des tRNA-Substrats. Größere Inhibitoren mit langen Seitenketten, die in die tRNA-Bindetasche hineinragen, sind aus sterischen Gründen nicht in der Lage die Guanin/preQ<sub>1</sub>-Bindestelle nach Anlagerung der tRNA und Ausschneiden des Guanins zu besetzen. Sie wirken folglich ausschließlich als kompetitive Inhibitoren in Bezug auf die tRNA (s. Abb. 3).



**Abbildung 3:** Mögliche Inhibitionsmechanismen der bakteriellen TGT.

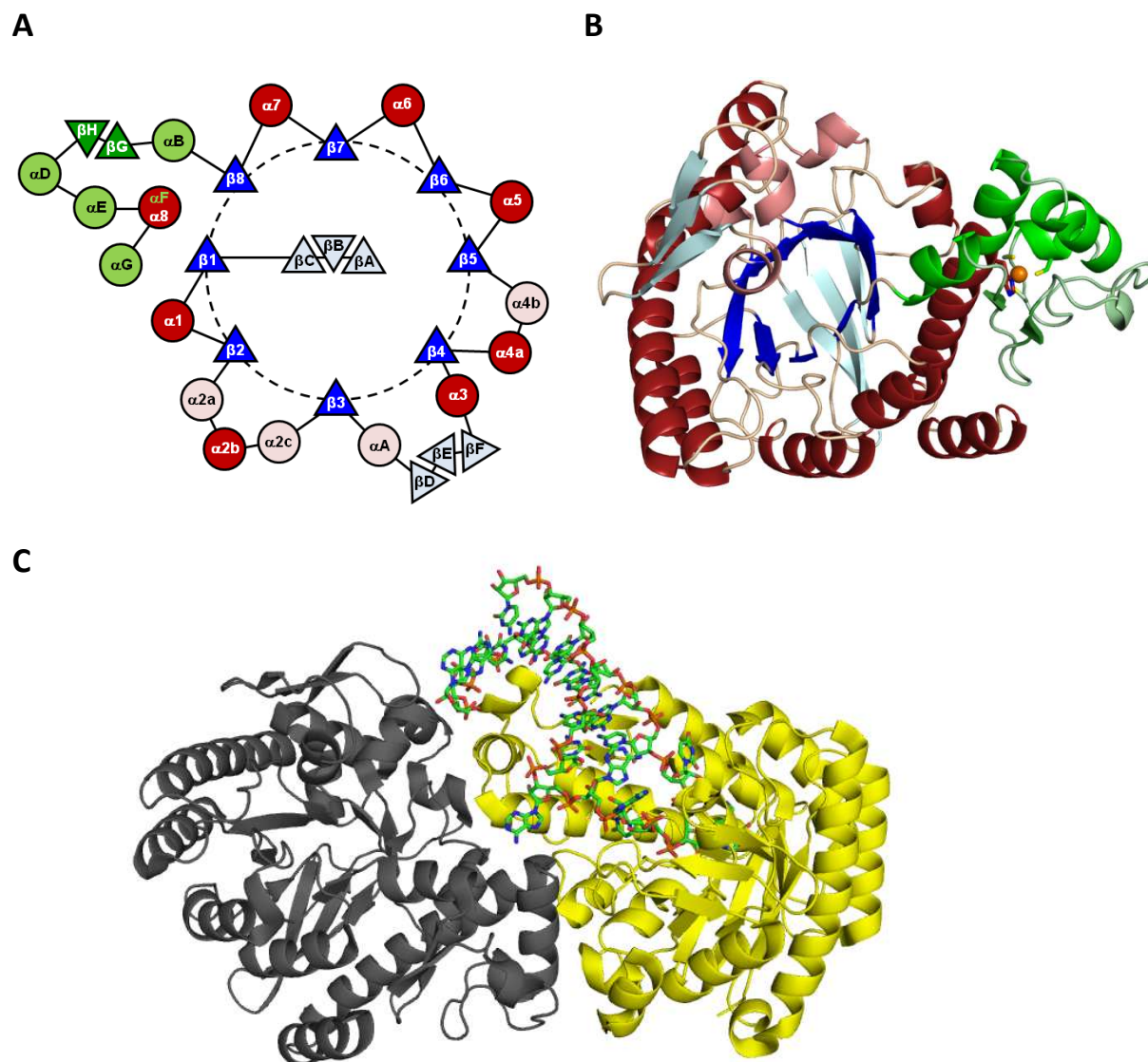
1. und 3.: Kompetitive Inhibition bezüglich der tRNA: preQ<sub>1</sub>-Mimetika / Inhibitoren mit langen Seitenketten blockieren die Guanin/preQ<sub>1</sub>-Bindetasche, Bindung der tRNA nicht mehr möglich.

2.: Unkompetitive Inhibition bezüglich der tRNA: preQ<sub>1</sub>-Mimetika binden an den TGT-tRNA-Komplex und verhindern dessen Weiterreagieren.

## 1.8 Aufbau der bakteriellen tRNA-Guanin-Transglykosylase

Die Kristallstruktur der TGT aus *Z. mobilis* wurde bereits 1996 mit einer Auflösung von 1,85 Å veröffentlicht [Romier et al., 1996b]. Im Jahr 2005 wurde darüber hinaus die Kristallstruktur der TGT aus *Thermotoga maritima* vom "Joint Center for Structural Genomics" in der PDB deponiert (Auflösung 1,90 Å), ohne dass jedoch bisher eine Veröffentlichung dazu vorliegt. Das Enzym weist eine irreguläre (β/α)<sub>8</sub>-Fassstruktur („TIM-barrel“) auf, die aus acht parallelen β-Strängen und α-Helices besteht [Reardon & Farber, 1995]. Das (β/α)<sub>8</sub>-Fass der TGT enthält einige Insertionen und ist am N-Terminus durch ein drei-strängiges antiparalleles β-Faltblatt erweitert. An den C-Terminus ist eine überwiegend α-helikale Zinkbindedomäne angefügt, an deren Aufbau die achte α-Helix des (β/α)<sub>8</sub>-Motivs über ihren N-Terminus (αF) beteiligt ist. Das hochkonservierte Zink-Bindungsmotiv besteht aus den vier Aminosäuren Cys318, Cys320, Cys323 und His349 (*Z. mobilis* TGT-Nummerierung), welche das strukturelle Zinkion tetraedrisch koordinieren [Romier et al., 1997] (Abb. 4). Die bakterielle TGT bildet in der aktiven Form ein Homodimer, welches durch Anwendung einer C2-Symmetrie aus dem Monomer erzeugt wird. Das Protomer ist aus 386 Aminosäuren aufgebaut und hat eine molare Masse von etwa 42,8 kDa [Romier et al., 1998]. Die *Z. mobilis* TGT weist eine 52 %ige Sequenzhomologie zur *S. flexneri* und *E. coli* TGT auf [Romier et al., 1997]. Besonders die Aminosäuren der Bindetaschen sind jedoch hoch konserviert, sodass sich die Bindetaschen der *Z. mobilis* und *S. flexneri* TGT nur in einer einzigen Aminosäure unterscheiden (Tyr106 im *Z. mobilis*-Enzym ist in der *S. flexneri*-TGT durch ein Phenylalanin

ersetzt). Diese hohe Sequenzhomologie der Bindetasche macht die *Z. mobilis* TGT zu einem geeigneten Homologiemodell für das strukturbasierte Design von potenten Inhibitoren der *S. flexneri* TGT [Grädler, et al., 2001].



**Abbildung 4:** Irreguläre  $(\beta/\alpha)_8$ -Fassstruktur der TGT

A: Topologiediagramm der TGT. Nummerierung der Sekundärstrukturelemente nach Xie et al. [2003]. Die Zinkbindedomäne ist grün gefärbt. Bei  $\alpha C$  handelt es sich um eine 3/10-Helix (zwischen  $\beta H$  und  $\alpha D$ ), die in dem gezeigten Topologiediagramm nicht berücksichtigt ist.

B: Bänder-Darstellung der TGT. Die acht parallelen  $\beta$ -Stränge, die das Fass bilden, sind blau und die  $\alpha$ -Helices rot gefärbt. Das strukturelle Zinkion ist als orangefarbene Kugel dargestellt. Die Seitenketten der Zn<sup>2+</sup>-koordinierenden Reste sind in der Stabrepräsentation gezeigt.

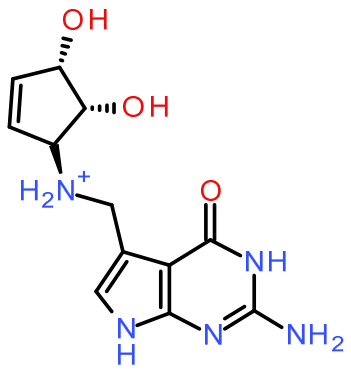
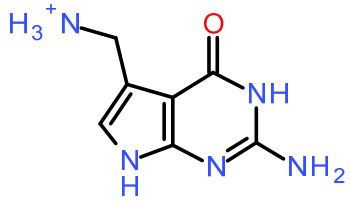
C: Bänder-Darstellung des aktiven Homodimers (gelb und grau). Das tRNA-Substrat (in Stabdarstellung) bindet mit den Basen U<sub>33</sub>, G<sub>34</sub> und U<sub>35</sub> in das katalytische Zentrum des Enzyms (PDB: 1Q2S).

## 1.9 Die eukaryotische tRNA-Guanin-Transglykosylase

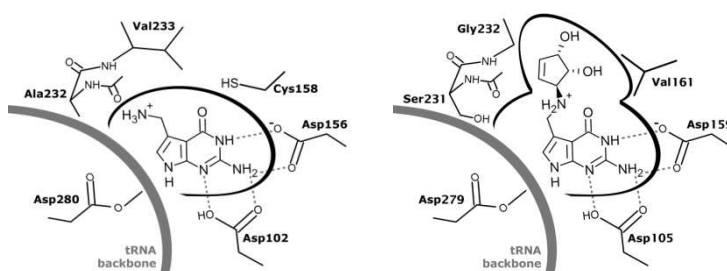
Im Gegensatz zur bakteriellen TGT, die ein Homodimer bildet, stellt die aktive eukaryotische TGT ein Heterodimer dar, besteht also aus zwei verschiedenen Untereinheiten. Obwohl noch keine Kristallstruktur der eukaryotischen TGT existiert, lässt sich aus den Primärstrukturen der Untereinheiten ableiten, dass sie jeweils eine Tertiärstruktur besitzen, die dem  $(\beta/\alpha)_8$ -Motiv der bakteriellen Tgt sehr ähnlich sind. In beiden Untereinheiten ist darüber hinaus das  $\text{Zn}^{2+}$ -Bindemotiv, welches aus drei Cysteinen und einem Histidin besteht, konserviert. Nur eine der beiden Untereinheiten enthält jedoch die für die Katalyse essentiellen Aspartatreste 102 und 280, die für die Basenerkennung notwendigen Reste Ser103, Asp156, Gln230 und Leu231, sowie die für die tRNA-Erkennung wichtigen Argininreste 286 und 289 (Nummerierung entspricht der *Z. mobilis*-TGT-Aminosäuresequenz) [Romier et al., 1997]. Offensichtlich besteht die eukaryotische TGT aus einer katalytisch aktiven [Deshpande et al., 2001] sowie aus einer nicht-katalytischen Untereinheit. Wahrscheinlich ist es Aufgabe der letzteren, die gebundene tRNA während der Basenaustauschreaktion in der richtigen Position und Orientierung zu halten. Während die katalytische Untereinheit der Maus-TGT eine Sequenzidentität von 43 % zur *Z. mobilis* TGT aufweist, zeigt die nicht-katalytische Untereinheit eine Sequenzidentität von nur ca. 20 % zu diesem Enzym. Die Sequenzidentität der nicht-katalytischen zur katalytischen Untereinheit ist ebenfalls moderat und beträgt bei der Maus-TGT 23 %. Sowohl für die menschliche als auch für die Maus-TGT (87% Sequenzidentität zueinander) wurde gezeigt, dass ein intaktes Heterodimer für die katalytische Aktivität Voraussetzung ist, denn in Abwesenheit des jeweiligen Dimerpartners sind beide Untereinheiten vollkommen inaktiv [Boland et al., 2009; Chen et al. 2010]. Der Nomenklatur von Boland et al. [2009] folgend wird die katalytische Untereinheit im weiteren Verlauf der Arbeit als QTRT1 (Queuin-tRNA-Ribosyltransferase 1) bezeichnet. Die nicht-katalytische Untereinheit erhält dagegen die allgemeine Bezeichnung QTRTD1 (Queuin-tRNA-Ribosyltransferase mit einer Protein-1 Domäne). Im Fall der nicht-katalytischen Untereinheit der Maus wurden von Boland et al. [2009] verschiedene Splice-Varianten nachgewiesen. Die mit größter Wahrscheinlichkeit physiologisch relevante Variante, wurde von dieser Arbeitsgruppe als v1 bezeichnet, weshalb die nicht-katalytische TGT-Untereinheit aus der Maus mit der Bezeichnung QTRTD1v1 versehen wurde. Wie bereits erwähnt, tauscht die eukaryotische TGT an Position 34 seiner Substrat-tRNAs Guanin direkt gegen Queuin aus. Ein Homologiemodell der humanen QTRT1-Untereinheit, das von Romier et al. [1997] mit



der *Z. mobilis* TGT-Kristallstruktur als Templat erzeugt wurde, zeigt, dass sich die aktiven Zentren der bakteriellen und eukaryotischen TGT in ihrem Aufbau nur geringfügig unterscheiden. Entscheidend für die unterschiedliche Substratspezifität der beiden Enzymvarianten scheint vor allem der Austausch von Val233 (*Z. mobilis*-TGT Nummerierung) gegen Gly232 (humane TGT-Nummerierung) zu sein. Dies führt im eukaryotischen Enzym zu einer deutlichen Vergrößerung der Bindetasche, die wohl für die Aufnahme des Cyclopentendiol-Restes von Queuin erforderlich ist (Abb. 5).

TGT	Eukaryoten	Bakterien
Quartärstruktur	Heterodimer	Homodimer
Ausgetauschte Base	Guanin 34	Guanin 34
Substrat Base	Queuin	preQ <sub>1</sub>
		

**Tabelle 1:** Substratbasen der eukaryotischen und der bakteriellen TGT.



**Abbildung 5:**

Links: schematische Darstellung der Bindetasche der *Z. mobilis* TGT mit gebundenem preQ<sub>1</sub>.  
 Rechts: schematische Darstellung der Bindetasche der humanen TGT mit gebundenem Queuin.  
 Abbildung aus Tidten, Diss. [2007]

### **1.10 Die physiologische Rolle von Queuin in Säugetieren und im Menschen**

Die physiologische Rolle von Queuin in Säugetieren und im Menschen ist noch wenig verstanden. Im Gegensatz zu Bakterien sind Eukaryoten nicht in der Lage, Queuin *de novo* zu synthetisieren, weshalb es mit der Nahrung oder über die Darmflora aufgenommen wird [Reynier et al., 1998]. Keimfreie Mäuse, die mit Tyrosin- und Queuin-freier Nahrung gefüttert werden, entwickeln mit der Zeit neurologische Symptome, die schließlich zum Tod der Mäuse führen [Marks & Farkas, 1997]. Wie Rakovich et al. [2011] zeigten, ist dies auf eine unkontrollierte Oxidation von Tetrahydrobiopterin zurückzuführen. Dies resultiert in einem Mangel an diesem Kofaktor, welcher für die Hydroxylierung von Phenylalanin zu Tyrosin erforderlich ist. Die Folge sind Symptome, welche denen der erblichen Stoffwechselkrankheit Phenylketonurie ähneln. Die genauen molekularen Zusammenhänge dieses Phänomens sind noch unbekannt. Bei zahlreichen klinischen und *in-vitro* Studien wurden Hypomodifikationen der tRNA in Bezug auf Queuin mit der Entstehung von verschiedenen Krebserkrankungen in Verbindung gebracht [Emmerich et al., 1992; Baranowski et al., 1994; Pathak and Vinayak, 2005]. Insgesamt mehren sich Hinweise, dass Queuin an Differenzierungs-, Proliferations- und Signal-Prozessen beteiligt ist [Iwata-Reuyl, 2003].

### **1.11 Zielsetzung dieser Arbeit**

Die vorliegende Arbeit setzt sich aus zwei relativ unabhängigen Projekten zusammen. Im Rahmen des ersten Projekts sollten Aminosäuren in der Bindetasche der prokaryotischen *Zymomonas mobilis* tRNA-Guanin-Transglykosylase (TGT) auf ihren Einfluss auf die Substratspezifität bezüglich tRNA, Guanin, preQ<sub>1</sub> und Queuin untersucht werden. Ein bereits vorliegendes Homologiemodell der eukaryotischen *Caenorhabditis elegans* TGT [Romier et al., 1997] ließ vermuten, dass der Austausch von Cys158 und Val233 in der bakteriellen TGT (*Z. mobilis* TGT Nummerierung) durch Valin bzw. Glycin einen immensen Einfluss auf die Substratspezifität hat. Somit wurde der Schwerpunkt bei diesem Teil der Arbeit auf die beiden Aminosäuren Cys158 und Val233 (*Z. mobilis* Nummerierung) gelegt. Es sollten dabei TGT-Varianten mit unterschiedlicher großer Bindetasche konstruiert und in ausreichenden Mengen produziert werden. Diese sollten dann hinsichtlich der Unterschiede in der

Substraterkennung und -bindung zum ursprünglichen bakteriellen Enzym charakterisiert werden.

Im Rahmen des zweiten Projekts galt es, ein Expressionssystem für die rekombinante Produktion der katalytischen Untereinheit der tRNA-Guanin-Transglykosylase (QTRT1) und der Queuin-tRNA-Ribosyltransferase mit einer Protein-1 Domäne (QTRTD1) aus der Maus und dem Menschen zu etablieren. Die gereinigten Zielproteine sowie das korrespondierende Heterodimer, sollten des Weiteren mittels eines Enzymassays kinetisch charakterisiert werden. Ebenfalls sollten massenspektrometrische Experimente unter nativen Bedingungen (NanoESI-MS) Hinweise auf die Quartärstruktur liefern. Schließlich sollten verschiedene Kristallisationsbedingungen mit den Einzelproteinen und dem Heterodimer getestet werden. Bei erhaltenen Proteinkristallen sollte die Strukturaufklärung der Proteine mittels Röntgenkristallographie erfolgen, um strukturelle Unterschiede zwischen der prokaryotischen und eukaryotischen TGT aufzudecken. Letzteres stellt eine Voraussetzung für die Entwicklung selektiver Arzneistoffen dar.

## 2 Investigation of Specificity Determinants in Bacterial tRNA-Guanine Transglycosylase Reveals Queuine, the Substrate of its Eucaryotic Counterpart, as Inhibitor

### Substrate Specificity in tRNA-Guanine Transglycosylase

---

Dieses Kapitel wurde publiziert und ist im Originaltext wiedergegeben (Biela I, Tidten-Luksch N, Immekus F, Glinca S, Nguyen P., Gerber HD, Heine A, Klebe G, Reuter R PLoS ONE. 2013; 8(5): e64240). Im Rahmen meiner Doktorarbeit leistete ich dazu folgende Beiträge: Proteinpräparation und –reinigung nahezu sämtlicher Tgt-Varianten, Mutagenese, Kinetische Charakterisierung sämtlicher Tgt-Varianten, Bestimmung der Kristallstrukturen 4gd0, 4e2v, 4hsh, 4hqv, 4h6e, 4gcx, 4hvx, 4h7x, WT-TGT-Q, Trapping-Experimente.

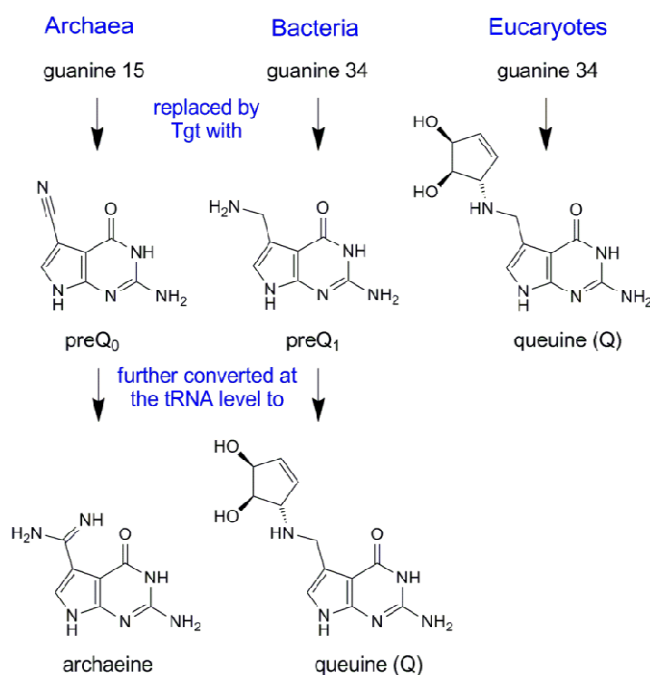
### 2.1 Abstract

Bacterial tRNA-guanine transglycosylase (Tgt) catalyses the exchange of the genetically encoded guanine at the wobble position of tRNAs<sup>His,Tyr,Asp,Asn</sup> by the premodified base preQ<sub>1</sub>, which is further converted to queuine at the tRNA level. As eucaryotes are not able to synthesise queuine *de novo* but acquire it through their diet, eucaryotic Tgt directly inserts the hypermodified base into the wobble position of the tRNAs mentioned above. Bacterial Tgt is required for the efficient pathogenicity of *Shigella* sp, the causative agent of bacillary dysentery and, hence, it constitutes a putative target for the rational design of *anti-Shigellosis* compounds. Since mammalian Tgt is known to be indirectly essential to the conversion of phenylalanine to tyrosine, it is necessary to create substances which only inhibit bacterial but not eucaryotic Tgt. Therefore, it seems of utmost importance to study selectivity-determining features within both types of proteins. Homology models of *Caenorhabditis elegans* Tgt and human Tgt suggest that the replacement of Cys158 and Val233 in bacterial Tgt (*Zymomonas mobilis* Tgt numbering) by valine and accordingly glycine in eucaryotic Tgt largely accounts for the different substrate specificities. In the present study we have created mutated variants of *Z. mobilis* Tgt in order to investigate the impact of a Cys158Val and a Val233Gly exchange on catalytic activity and substrate specificity. Using enzyme kinetics and X-ray crystallography, we gained evidence that the Cys158Val mutation reduces the affinity to preQ<sub>1</sub> while leaving the affinity to guanine unaffected. The Val233Gly exchange leads to an enlarged substrate binding pocket, that is necessary to accommodate queuine in a conformation compatible with the intermediately covalently bound tRNA

molecule. Contrary to our expectations, we found that *a priori* queuine is recognised by the binding pocket of bacterial Tgt without, however, being used as a substrate.

## 2.2 Introduction

Transfer RNA–guanine transglycosylase (Tgt, EC 2.4.2.29) catalyses the exchange of a specific guanine residue within in a tRNA molecule by a substituted 7-deazaguanine. Although Tgt is found in all three domains of life, the specificity of this enzyme with respect to (i) the tRNA substrate, (ii) the position of the guanine therein to be exchanged, and (iii) the 7-deazaguanine derivative to be inserted differs in archaea, bacteria and eucaryotes [for review see Stengl et al. 2005]. Such, archaeal Tgt inserts preQ<sub>0</sub> at position 15 of the majority of archaeal tRNAs where it is further converted to archaeine (for chemical formulae see Figure 6). Located at the "elbow" of the L-shaped tRNA this modification stabilises the overall tRNA structure by supporting the formation of the non-canonical Levitt base pair with cytosine 48 [Oliva et al. 2007].



**Figure 6.** Substrate bases of the Tgt enzymes from the three domains of life.

preQ<sub>0</sub>, 7-cyano-7-deazaguanine; preQ<sub>1</sub>, 7-aminomethyl-7-deazaguanine; Q, queuine = 7-(((4,5-*cis*-dihydroxy-2-cyclopenten-1-yl) amino) methyl)-7-deazaguanine.

In contrast, both bacterial and eucaryotic Tgt is required for the introduction of the hypermodified base queuine (Q) into position 34 (the anticodon "wobble position") of tRNAs<sup>His, Tyr, Asp, Asn</sup> all of which have a uracil 33 – guanine 34 – uracil 35 sequence in common

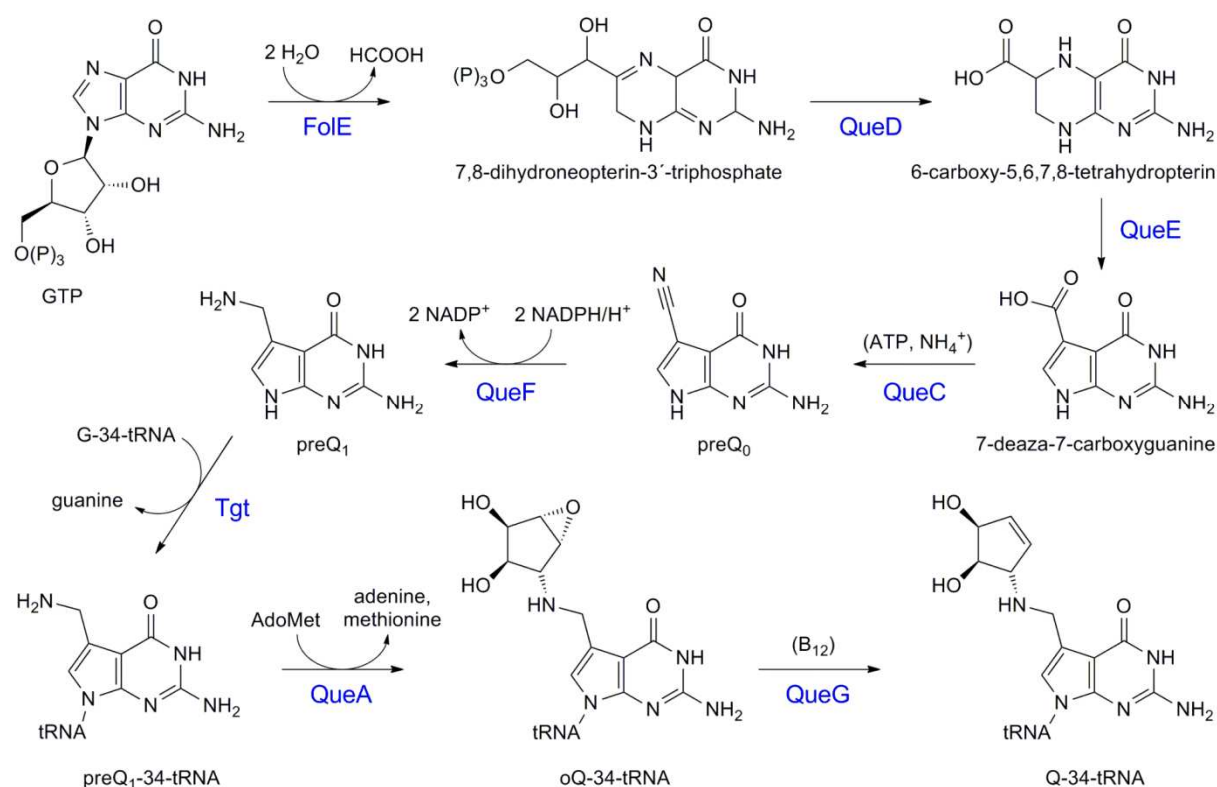
[Nakanishi et al. 1994, Curnow & Garcia 1995]. Although no definitive function for Q has been demonstrated yet, its presence in the tRNA anticodon suggests that it may be involved in coordinating translational fidelity and speed.

Bacterial Tgt replaces the genetically encoded guanine at the above-mentioned position by the Q-precursor preQ<sub>1</sub>. This premodified base is synthesised from guanosine 5'-triphosphate in a pathway employing GTP cyclohydrolase I (FolE) [Phillips et al. 2008], 6-carboxy-5,6,7,8-tetrahydropterin synthase (QueD) [McCarthy et al. 2009], an *S*-adenosyl-L-methionine-dependent organic radical-generating enzyme (QueE), preQ<sub>0</sub> synthetase (QueC = ToyM) [McCarthy et al. 2009] and a nitrile reductase (QueF) [Van Lanen et al. 2005, Lee et al. 2007, Kim et al. 2010]. Once incorporated into tRNA, preQ<sub>1</sub> is further converted to the functional Q base in two consecutive steps catalysed by *S*-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase (QueA) [Van Lanen et al. 2003, Mathews et al. 2005, Grimm et al. 2006] and the coenzyme B<sub>12</sub>-dependent epoxyqueuosine reductase (QueG) [Frey et al. 1988, Miles et al. 2011] (Figure 7).

Bacterial Tgt functions as a homodimer in which the protomer consists of a (β $\alpha$ )<sub>8</sub> barrel harbouring a Zn<sup>2+</sup> binding subdomain close to the C-terminus [Romier et al. 1996b]. For sterical reasons, this dimer is, although endowed with two active sites, able to bind and convert only one substrate tRNA molecule at a time [Ritschel et al. 2009a]. The reaction catalysed by bacterial Tgt is well documented by numerous biochemical studies and the crystal structures of Tgt from *Zymomonas mobilis* determined in its apo-form, in the presence of guanine, preQ<sub>1</sub> or small molecule inhibitors and in complex with an RNA substrate [Romier et al. 1996b; Grädler et al. 1999; Grädler et al. 2001; Goodenough-Lashua & Garcia 2003; Xie et al. 2003; Tidten et al. 2007; Meyer et al. 2006; Garcia et al. 2009]. It follows a ping pong mechanism including a covalent Tgt·tRNA intermediate (Figure 8).

Since eucaryotes are, other than bacteria, not capable of synthesising Q *de novo* but rather acquire this modified base from diet or from the gut flora, eucaryotic Tgt has to directly recognise and insert Q base into position 34 of tRNAs<sup>His,Tyr,Asp,Asn</sup>. This stands in contrast to bacterial Tgt which was reported to be unable to accept this base as a substrate [Okada & Nishimura 1979; Chen et al. 2010]. Unlike its bacterial counterpart, eucaryotic Tgt constitutes a *heterodimer* with both subunits, however, being homologous to the bacterial protomer [Boland et al. 2009; Chen et al. 2010]. Accordingly, both subunits contain the three cysteines as well as the histidine required for coordination of the structural Zn<sup>2+</sup> ion. Yet,

only one subunit includes the residues known to be important for catalysis, among those the active-site nucleophile, Asp280 (*Z. mobilis* Tgt numbering) [Xie et al. 2003; Garcia et al. 2009]. Obviously, eucaryotic Tgt consists of a catalytic subunit and a second subunit which most probably supports binding and orientation of the tRNA substrate during catalysis.



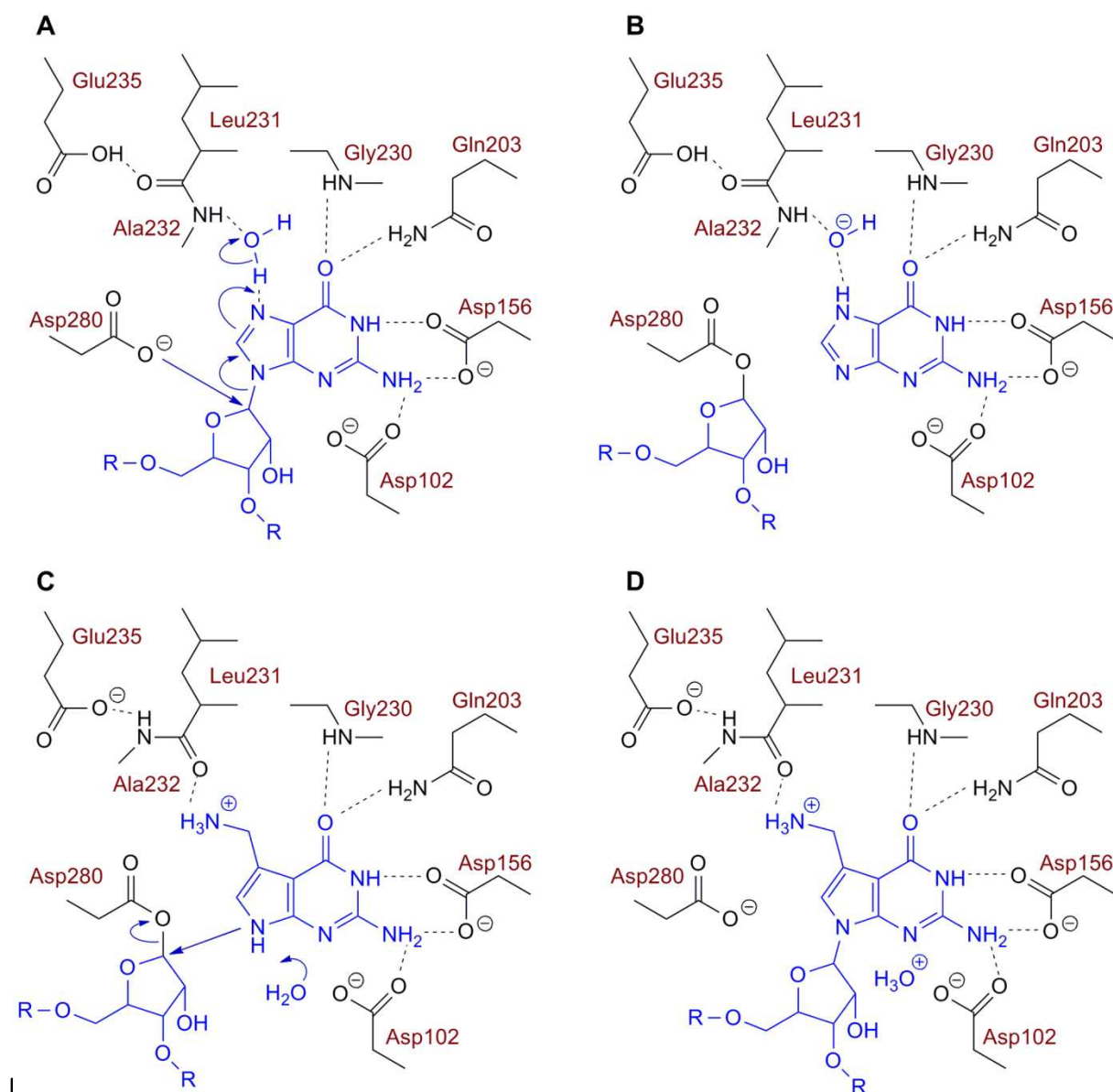
**Figure 7.** Biosynthesis of the modified tRNA base queueine (Q).

Substrates and Cosubstrates: AdoMet, *S*-adenosylmethionine; B<sub>12</sub>, coenzyme B<sub>12</sub>; oQ, epoxyqueueine; preQ<sub>0</sub>, 7-cyano-7-deazaguanine; preQ<sub>1</sub>, 7-aminomethyl-7-deazaguanine; enzymes: FolE, GTP cyclohydrolase I; QueD, 6-carboxy-5,6,7,8-tetrahydropterin synthase; QueE, 7-carboxy-7-deazaguanine synthase; QueC, preQ<sub>0</sub> synthetase; QueF, preQ<sub>0</sub> reductase; Tgt, tRNA-guanine transglycosylase; QueA, *S*-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase; QueG, oQ reductase.

It was shown that a functional Tgt is required for efficient pathogenicity of *Shigella* bacteria which are the causative agents of bacillary dysentery. A null-mutation in the *tgt* gene leads to a strongly reduced translation of *virF*-mRNA encoding a transcriptional activator required for the expression of a large number of *Shigella* pathogenicity genes [Durand et al. 2000]. So far, the exact reason for this phenomenon is unknown, though Hurt et al. [2007] showed that Tgt is able to replace guanine 421 of *virF* mRNA by preQ<sub>1</sub>. Possibly, this unusual modification of an mRNA molecule might have a stimulating effect on its translation. In any case, the fact that full pathogenicity of *Shigella* ssp. relies on Tgt activity brought us to use

this enzyme as a target for the rational design of *anti*-Shigellosis compounds. Meanwhile, on the basis of the high-resolution crystal structure of *Z. mobilis* Tgt, inhibitors have been synthesised which show an affinity to bacterial Tgt down to the single-digit nanomolar range [Ritschel et al. 2009b; Ritschel et al. 2009c; Kohler et al. 2009].





(A and B) The glycosidic bond of guanosine 34 is cleaved *via* nucleophilic attack by the Asp280 carboxylate resulting in the formation of a covalent Tgt-tRNA intermediate. (C and D) Guanine is replaced by preQ<sub>1</sub> which is incorporated into the tRNA *via* nucleophilic attack of the ribose 34 anomeric carbon by N9 of preQ<sub>1</sub>. Notably the replacement of guanine by preQ<sub>1</sub> in the binding pocket of Tgt induces a flip of the Leu231/Ala232 peptide bond. The formation of a hydroxide and an oxonium ion as byproducts of the reaction is assumed to be responsible for its irreversibility as mutual neutralisation will efficiently detract these ions from equilibrium. *H*-bonds are indicated by dashed lines.

Since a Tgt enzyme is present in human as well, it is highly desirable to create inhibitors which preferably bind the bacterial while leaving the eucaryotic one unaffected. This seems of particular significance as it was recently shown that in mice Q deficiency or disruption of the *tgt* gene impairs conversion of phenylalanine to tyrosine due to uncontrolled oxidation of the cofactor tetrahydrobiopterin [Rakovich et al. 2011]. With this observation in mind, it is

of utmost importance to study selectivity-determining features within both types of proteins.

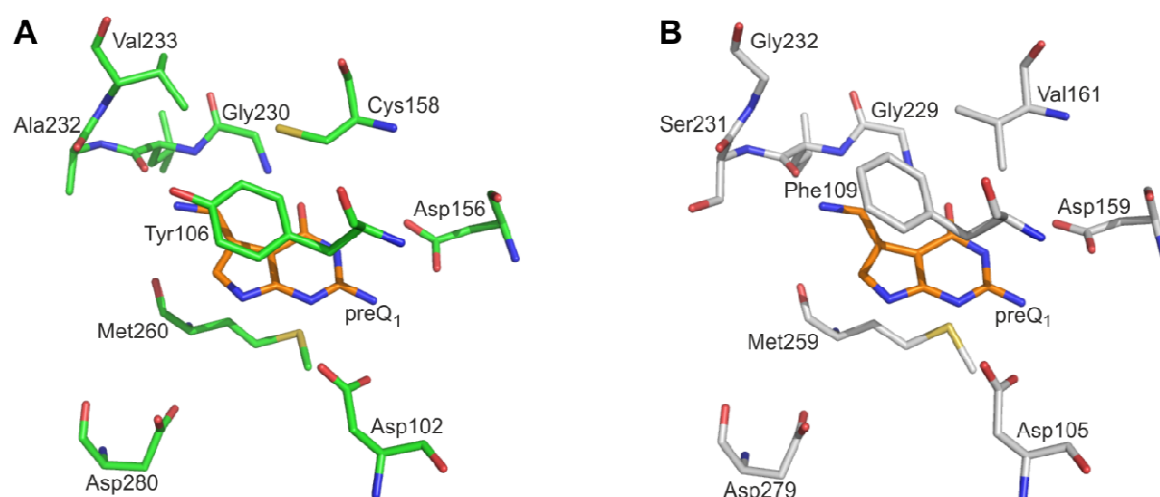
Although no crystal structure of a eucaryotic Tgt has been determined yet, a homology model of the *Caenorhabditis elegans* Tgt catalytic subunit based on the structure of *Z. mobilis* Tgt as a template suggests high structural similarity of the active sites of bacterial and eucaryotic Tgt [Romier et al. 1997]. In the eucaryotic enzyme, however, recognition of the bulkier substrate is most probably enabled by a spatial expansion of the binding pocket. This enlargement of the binding pocket is caused by a single replacement of Val233 (*Z. mobilis* Tgt numbering) in bacterial Tgt by glycine in the eucaryotic catalytic subunit [Romier et al. 1997]. Apart from that, the model suggests that only minor changes might be necessary to convert the binding pocket of bacterial Tgt into one exhibiting the specificity of the eucaryotic enzyme. Hence, in an attempt to generate a model system for the active site of human Tgt and to gain insights into the relevance of particular amino acids for substrate base selectivity, we adapted the *Z. mobilis* Tgt active site by site-directed mutagenesis to resemble the one of the human enzyme. The present paper describes the extensive analysis of mutated *Z. mobilis* Tgt variants created with this objective.

## **2.3 Results**

### **2.3.1 Generation of an *in silico* homology model of the human Tgt catalytic subunit**

In 2009 Boland *et al.* reported the first successful isolation and characterisation of an enzymatically active eucaryotic Tgt, namely the heterologously produced heterodimeric murine enzyme [Boland et al. 2009]. Shortly thereafter, Chen *et al.* published the production, purification and kinetic characterisation of recombinant human Tgt [Chen et al. 2010]. However, no crystal structure of either of these enzymes is yet available, and the only structural information concerning the active site of a eucaryotic Tgt stems from a homology model of the *Caenorhabditis elegans* catalytic subunit [Romier et al. 1997]. Since, meanwhile, the complete sequence of the human catalytic subunit is available [Chen et al. 2010, Deshpande and Katze 2001] we created a model of this orthologue using the crystal structure of *Z. mobilis* Tgt as a template (for experimental details see the "Materials and

Methods" section). The model reveals that most residues establishing the active centre and substrate binding pocket are identical in the bacterial and human enzyme. A striking difference, however, is the exchange of Val233 in *Z. mobilis* Tgt by a glycine (Gly232) in human Tgt (Figure 9). This leads to an enlarged binding pocket of the human enzyme, obviously necessary to accommodate the dihydroxy-cyclopentenyl side chain of Q which is missing in preQ<sub>1</sub>, the physiological substrate of the bacterial enzyme (Figure 6). A further conspicuous difference which might influence substrate selectivity is the exchange of Cys158 in *Z. mobilis* Tgt by a valine residue (Val161) in human Tgt. The side chain of Val161 in the model of human Tgt is at a position where it is likely to contact the dihydroxy-cyclopentenyl moiety of a bound Q molecule. Lastly, there is a conservative amino acid exchange in the binding pocket of the human compared to the *Z. mobilis* enzyme which will, however, most probably not affect substrate selectivity. Tyr106 within the active centre of *Z. mobilis* Tgt forms *via* its aromatic side chain a stacking interaction with the bound substrate base (see Figure 9). Not only in the human enzyme it is replaced by a phenylalanine (Phe109), but also in the majority of bacterial Tgts whose sequences are known so far. It must be noted that all of the mentioned amino acid exchanges are observed in the model of the *C. elegans* Tgt catalytic subunit too [Romier et al. 1997].



**Figure 9.** Substrate base binding pocket of *Z. mobilis* Tgt and modelled human Tgt.

A) Detail of *Z. mobilis* Tgt-preQ<sub>1</sub> complex crystal structure (pdb-code: **1p0e**) showing the active site with the bound substrate in stick representation. Carbon atoms of protein residues are coloured in green, those of preQ<sub>1</sub> in orange. B) Homology model of human Tgt created with the *Z. mobilis* Tgt crystal structure as a template. The close up shows active site residues (carbon atoms in grey) superimposed with preQ<sub>1</sub> (carbon atoms in orange) as present in **1p0e**.

### 2.3.2 Point mutations aimed at enabling *Z. mobilis* Tgt to bind Q and kinetic characterisation of the mutated variants

To investigate the importance of Gly232 and Val161 in human Tgt for Q base recognition, we created a doubly mutated variant of the *Z. mobilis* enzyme in which the corresponding Val233 and Cys158 were exchanged by glycine and valine, respectively. In addition, we created two further variants, each containing solely one of the above named amino acid exchanges. To match the situation in the active site of human Tgt, we did not introduce the mutations into wild type *Z. mobilis* Tgt but into the Tyr106Phe variant of *Z. mobilis* Tgt. This variant had been created in the course of a former study and it had been shown that the mutation of Tyr106 to phenylalanine has no measurable impact on any of the catalytic properties of the enzyme [Brenk et al. 2003]. In the following, this mutation will not be mentioned explicitly anymore and Tgt(Tyr106Phe) will henceforth be referred to as "wild type" Tgt.

	tRNA <sup>Tyr**</sup>	guanine	preQ <sub>1</sub>
<b>"Wild type" Tgt</b>			
$K_M$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$0.9 \pm 0.2$	$1.2 \pm 0.2$	$0.9 \pm 0.1$
$k_{\text{cat}}$ ( $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ )***	$53.6 \pm 0.1$	$55.8 \pm 0.1$	$106.0 \pm 2.7$
<b>Tgt(Cys158Val)</b>			
$K_M$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$2.1 \pm 0.2$	$1.4 \pm 0.2$	$16.0 \pm 2.4$
$k_{\text{cat}}$ ( $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ )***	$28.1 \pm 0.3$	$27.5 \pm 0.2$	$35.0 \pm 0.8$
<b>Tgt(Val233Gly)</b>			
$K_M$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$2.0 \pm 0.3$	$1.0 \pm 0.2$	$0.6 \pm 0.1$
$k_{\text{cat}}$ ( $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ )***	$5.4 \pm 0.3$	$4.6 \pm 0.3$	$6.3 \pm 0.2$
<b>Tgt(Cys158Val/Val233Gly)</b>			
$K_M$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$1.4 \pm 0.4$	$2.7 \pm 0.3$	$13.5 \pm 3.1$
$k_{\text{cat}}$ ( $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ )***	$0.8 \pm 0.1$	$0.6 \pm 0.1$	$1.0 \pm 0.3$

\* All Tgt variants considered in this table including "wild type" Tgt contain an additional Tyr106Phe mutation which in a previous study was shown to have no impact on any of the catalytic properties of the enzyme [Brenk et al. 2003] (see main text).

\*\* Using [8-<sup>3</sup>H]-guanine as second substrate.

\*\*\* Taking into account that Tgt is a homodimer able to bind and convert only one substrate tRNA molecule at a time [Ritschel et al. 2010].

**Table 2.** Kinetic parameters for "wild type" Tgt and mutated Tgt variants.\*

To analyse the influence of the introduced Val233Gly and Cys158Val mutations on binding of the different substrate bases and on catalysis, we measured kinetic parameters for the mutated variants and "wild type" Tgt. At first,  $K_M$  and  $k_{cat}$  for guanine and tRNA<sup>Tyr</sup> were analysed *via* monitoring incorporation of [8-<sup>3</sup>H]-guanine into tRNA<sup>Tyr</sup>. None of the mutations had, either alone or in combination, any significant influence on  $K_M$ (guanine) or  $K_M$ (tRNA<sup>Tyr</sup>), yet  $k_{cat}$  was, compared to "wild type" enzyme, decreased for all three variants (see Table 2). While for Tgt(Cys158Val) the turnover number was only marginally reduced by a factor of two, it was lowered by one order of magnitude for Tgt(Val233Gly). In Tgt(Cys158Val/Val233Gly) the combination of both mutations led to a decrease in  $k_{cat}$  by two orders of magnitude.

Subsequently, kinetic parameters were determined for preQ<sub>1</sub> by measuring incorporation of [<sup>3</sup>H]-preQ<sub>1</sub> into tRNA<sup>Tyr</sup>. For Tgt(Cys158Val) also  $k_{cat}$ (preQ<sub>1</sub>) was only slightly reduced by a factor of three compared to "wild type" Tgt. Remarkably, however, this mutation caused an increase of  $K_M$ (preQ<sub>1</sub>) by one order of magnitude, a loss of affinity which had not been observed for guanine. In contrast, no decrease in preQ<sub>1</sub> affinity was detected for Tgt(Val233Gly) while, compared to "wild type" Tgt,  $k_{cat}$ (preQ<sub>1</sub>) was decreased by one order of magnitude. As observed for guanine as a substrate, the combination of both mutations in Tgt(Cys158Val/Val233Gly) led to a decrease in  $k_{cat}$ (preQ<sub>1</sub>) by two orders of magnitude. Furthermore,  $K_M$ (preQ<sub>1</sub>) of Tgt(Cys158Val/Val233Gly) was increased by more than a factor of ten, confirming that the Cys158Val exchange results in a measurable loss of affinity to this substrate base.

Ultimately, we intended to determine kinetic parameters for the three mutated Tgt variants as well as for "wild type" Tgt with respect to Q. Low activity was apparently observed with "wild type" Tgt, Tgt(Cys158Val) and Tgt(Val233Gly) by measuring incorporation of [<sup>3</sup>H]-Q into tRNA<sup>Tyr</sup>. Close inspection of the measured progress curves, however, revealed that the observed activities were obviously not due to the insertion of Q into substrate tRNA. At Q concentrations equal to or exceeding the concentration of tRNA<sup>Tyr</sup> (15 µmol·L<sup>-1</sup>), the initially observed insertion of radiolabelled base into tRNA came already to a stop when < 10 % of the tRNA was labelled (data not shown). This observation may be interpreted such that the used [<sup>3</sup>H]-Q preparation contained a [<sup>3</sup>H]-labelled contaminant which was inserted with measurable turnover (this contaminant might possibly be 7-deaza-7-hydroxymethylguanine resulting from reduction of the corresponding aldehyde which was used as starting material

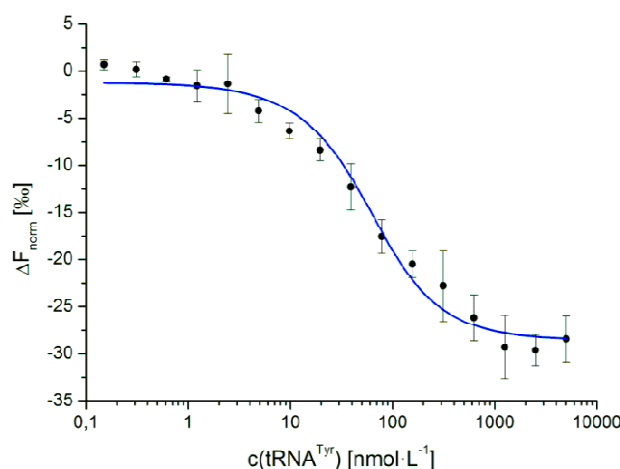
for Q synthesis [Chen et al. 2011]). After the majority of this more potent impurity was incorporated into tRNA<sup>Tyr</sup>, the Q base was apparently hardly or not inserted. Accordingly, this unexpected restriction did not allow us to figure out whether "wild type" Tgt, Tgt(Cys158Val) and Tgt(Val233Gly) were indeed able to accept Q as a substrate much less to determine Michaelis-Menten parameters as an indicator for affinity and catalytic activity. Therefore, we applied an alternative assay tracing the decrease in radioactivity of tRNA<sup>Tyr</sup> labelled at position 34 with [8-<sup>3</sup>H]-guanine due to the incorporation of unlabelled Q base. Compared to the commercially purchased [<sup>3</sup>H]-Q, the "cold" Q base used for this assay was produced *via* a completely different synthetic route with preQ<sub>1</sub> as starting material. NMR analysis of this Q preparation had revealed no detectable preQ<sub>1</sub> contamination implying that, if present, its portion amounted to < 1 ‰ [Gerber and Klebe 2012]. In fact, when Q was used from this highly pure preparation at a concentration of 50 µmol·L<sup>-1</sup> no insertion of Q into tRNA<sup>Tyr</sup> was observed for "wild type" Tgt or any of the mutated variants during a time period of four hours. In contrast, when, as a positive control, 10 µmol·L<sup>-1</sup> ("cold") preQ<sub>1</sub> was used in this assay, insertion of this base into 90 % of the tRNA (in this assay present at a concentration of 8 µmol·L<sup>-1</sup>) was achieved by "wild type" Tgt within < 10 minutes (data not shown).

### **2.3.3 Affinity of tRNA<sup>Tyr</sup> to Tgt as determined by microscale thermophoresis**

Since none of the Tgt variants investigated in this study showed turnover when Q was used as substrate it was not possible to determine  $K_M(Q)$  as a measure of affinity. Therefore, in order to gain information about the ability of these variants to bind Q we intended to use "microscale thermophoresis" to quantify dissociation constants ( $K_D$ ) of the enzyme-Q complexes. This method is based on a microscale temperature gradient which is produced in a solution within a capillary by an infrared LED laser. Proteins (as well as any other molecules) show a directional motion along the temperature gradient determined by their size, charge and hydration shell which in turn are influenced by the presence or absence of a bound ligand. Any change in the above named parameters caused by ligand binding affects the thermophoretic movement of the investigated protein, allowing the determination of binding affinities [Jerabek-Willemsen et al. 2011]. To assess the applicability of this method

to *Z. mobilis* Tgt we intended to determine  $K_D$  values for guanine, preQ<sub>1</sub>, Q and tRNA<sup>Tyr</sup> complexes of Tgt. However, no change in thermophoresis was observed upon addition of guanine, preQ<sub>1</sub> and Q proving this method unsuitable to investigate the affinities of these bases to Tgt and its mutated variants.

In contrast, a strong influence on the thermophoretic behaviour of Tgt was noticed upon binding of the macromolecular substrate tRNA<sup>Tyr</sup> enabling determination of  $K_D(\text{Tgt} \cdot \text{tRNA}^{\text{Tyr}})$  which amounted to  $36.2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1} \pm 5.7 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (Figure 10). This value is considerably lower than  $K_M(\text{tRNA}^{\text{Tyr}})$  (Table 2) indicating an affinity of Tgt to this substrate which is clearly higher than so far assessed by enzyme kinetic studies. The reason for this discrepancy may be that binding of guanine to apo-Tgt prevents binding of tRNA<sup>Tyr</sup> to the enzyme. Thus, guanine not only acts as a substrate but also as a competitive inhibitor with respect to tRNA. As guanine is present in a saturating concentration in any assay aimed at determining  $K_M(\text{tRNA}^{\text{Tyr}})$  of Tgt, the recorded value may not constitute a reliable measure but will rather lead to a significant underestimation of the enzyme's affinity to tRNA<sup>Tyr</sup>.



**Figure 10.** Binding of tRNA<sup>Tyr</sup> to Tgt measured by Microscale thermophoresis.

Alexa Fluor®647 labelled Tgt at a concentration of  $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  was incubated with varying amounts of tRNA<sup>Tyr</sup>. The difference in normalised fluorescence as a measure of change in thermophoresis is plotted against the concentration of tRNA<sup>Tyr</sup>.

### 2.3.4 Inhibition of Tgt and its mutated variants by Q

Since Q is not used as a substrate by "wild type" Tgt and our mutated variants, specific binding of this base to the active centres of these enzymes should inevitably cause their inhibition. To verify an inhibitory effect of Q on Tgt activity, we measured the activity of

"wild type" Tgt, Tgt(Cys158Val), Tgt(Val233Gly) and Tgt(Cys158Val/Val233Gly) using guanine and tRNA<sup>Tyr</sup> as substrates both in the presence and absence of a low  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  concentration of Q. Indeed, a considerable Q-dependent decrease in activity was observed for all investigated Tgt variants (see below).

As inhibitors mimicking the nucleobases guanine or preQ<sub>1</sub> are in principle able to inhibit Tgt in two different ways, we next determined the inhibition mode *via* that Q acts on the investigated enzyme variants. If an inhibitor binds to the guanine 34 / preQ<sub>1</sub> 34 subpocket of the apo-enzyme, it will block access of the tRNA to the enzyme and thus act as a competitive inhibitor with respect to the tRNA substrate. If, however, such an inhibitor occupies this subpocket after tRNA binding and removal of guanine 34 it will prevent the substrate base preQ<sub>1</sub> from binding. Accordingly, further reaction of the covalent Tgt·tRNA intermediate is disabled corresponding to an uncompetitive inhibition with respect to the tRNA substrate. Nucleobase mimetics of comparable size as guanine or preQ<sub>1</sub> normally act *via* both described inhibition modes. Nucleobase mimetics endowed with bulky exocyclic substituents, however, generally constitute purely competitive inhibitors with respect to tRNA as their binding to the covalent Tgt·tRNA complex would sterically interfere with the tRNA sugar phosphate backbone.

To figure out the inhibition mode *via* that Q acts on the investigated Tgt variants we applied a trapping experiment which had been used for a similar purpose by Meyer *et al.* [Meyer *et al.* 2006]. Incubation of Tgt with substrate tRNA in the presence of excess uncompetitive inhibitor leads to a considerable stabilisation of the covalent Tgt·tRNA intermediate which can be visualised in terms of two retarded bands on a Coomassie-stained gel after SDS-PAGE of the reaction mixture (the presence of two retarded bands representing this complex results from different tRNA conformers present under the applied PAGE conditions [Kung and Garcia 1998]). In the absence of any inhibitor, only a very small amount of the covalent intermediate is detectable under the used assay conditions. The presence of excess inhibitor which solely and efficiently acts as a competitive inhibitor with respect to substrate tRNA entirely suppresses the formation of the covalent intermediate.

Thus, we incubated "wild type" Tgt, Tgt(Cys158Val), Tgt(Val233Gly) and Tgt(Cys158Val/Val233Gly) with tRNA<sup>Tyr</sup> in the presence of excess Q base. As a control, we incubated each of these Tgt variants solely with tRNA<sup>Tyr</sup> as well as with tRNA<sup>Tyr</sup> plus an excess of the preQ<sub>1</sub> mimetic 2,6-diamino-3*H*-quinazolin-4-one (DAQ) (Figure 11A) which constitutes



a potent uncompetitive inhibitor of Tgt ( $K_{iu} = 0.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) [Meyer et al. 2006]. Subsequently, we subjected the reaction mixtures to SDS-PAGE. In case of "wild type" Tgt and Tgt(Cys158Val) no retarded band representing the covalent Tgt-tRNA intermediate was detectable on the Coomassie-stained gel, if, in addition to the enzyme, only tRNA<sup>Tyr</sup> had been present in the reaction mixture (Figure 11B, lanes 2 and 8). This indicates that any excised guanine was quickly back-inserted into tRNA keeping the amount of the covalent complex below the detection limit of the assay. In contrast, under the same conditions a faint band representing the covalent enzyme-tRNA complex was observed for Tgt(Val233Gly) and Tgt(Cys158Val/Val233Gly) indicating that the back-insertion rate of the excised guanine was significantly decreased for these Tgt variants (Figure 11B, lanes 5 and 11). If, in addition to tRNA<sup>Tyr</sup> excess DAQ had been added, in case of all Tgt variants the majority of enzyme was trapped in a covalent complex formed with tRNA<sup>Tyr</sup>. On the Coomassie-stained gel this complex was visible as two clear retarded bands concomitant with considerable weakening of the band corresponding to the uncomplexed enzyme (Figure 11B, lanes 4, 7, 10 and 13). If, instead of DAQ, Q base had been added to the reaction mixture, the formation of the covalent intermediate was completely suppressed in case of "wild type" Tgt, Tgt(Cys158Val) and Tgt(Val233Gly) (Figure 11B, lanes 3, 6 and 9). This suggests that for these Tgt variants, Q predominantly acts as a competitive inhibitor with respect to substrate tRNA. Solely in case of Tgt(Cys158Val/Val233Gly) a very faint band representing the covalent enzyme-tRNA complex was visible in the presence of excess Q (Figure 11B, lane 12). This may constitute a hint that, in case of this mutated variant, Q is to some extent able to bind to the guanine 34 / preQ<sub>1</sub> subpocket of the covalent enzyme-tRNA complex resulting in an inhibition uncompetitive with tRNA binding. The fact, however, that the band representing the covalent enzyme-tRNA complex is clearly weaker than that observed in absence of Q suggests that Q will also mainly bind to this mutated variant when present in the apo-form. To gain information concerning the affinity of Q to "wild type" Tgt and our mutated variants we determined, according to the method described in [Meyer et al. 2006], the corresponding competitive inhibition constants with respect to tRNA ( $K_{ic}$ ) of Q.  $K_{ic}(Q)$  amounted to  $3.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \pm 0.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  for "wild type" Tgt,  $3.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \pm 0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  for Tgt(Cys158Val),  $3.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \pm 0.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  for Tgt(Val233Gly) and  $8.9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \pm 1.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  for Tgt(Cys158Val/Val233Gly). These results show that all studied Tgt variants including "wild type" Tgt are able to bind Q with nearly identical affinity.



**Figure 11.** Trapping experiments performed with Tgt/tRNA mixtures in presence of queueine or 2,5-diamino-3*H*-quinazolin-4-one.

A) Chemical structure of 2,6-diamino-3*H*-quinazolin-4-one (DAQ), an uncompetitive inhibitor of Tgt B) SDS-PAGE analysis of reaction mixtures of Tgt or mutated variants thereof and tRNA<sup>Tyr</sup> under conditions indicated. SM, size marker; Q, queueine. While DAQ causes retarded Tgt bands by stabilising the covalent Tgt·tRNA intermediate, Q lacks this ability for most of the investigated Tgt variants. Solely in case of Tgt(Cys159Val/Val233Gly) a faint retarded band is visible indicating that Q may to some extent be able to bind to the guanine 34 / preQ<sub>1</sub> subpocket of the covalent enzyme·tRNA complex.

### 2.3.5 Crystal structure analyses of "wild type" Tgt and its mutated variants

To allow the interpretation of the obtained data at a structural level, we determined the crystal structures of the mutated Tgt variants created in this study in their apo-forms as well as in complex with preQ<sub>1</sub> and Q. In addition, we determined the crystal structure of "wild type" Tgt with a bound Q molecule. Structures of "wild type" Tgt in its apo-form and in complex with preQ<sub>1</sub> had already been published in a former study [Brenk et al. 2003] and thus, were available in the protein data bank (PDB codes: [1ozm](#) and [1ozq](#), respectively). An overview of the crystal structures considered in the present study is given in Table S1, while detailed data statistics are presented in Table 3.

The  $2|F_o| - |F_c|$  electron density maps of all apo-structures clearly allow the identification of the introduced mutations, although poorly defined density is present for Gly233 both in the

structures of Tgt(Val233Gly) and Tgt(Cys158Val/Val233Gly). In the electron density maps of Tgt(Cys158Val) and of Tgt(Cys158Val/Val233Gly) the isopropyl side chain of Val158 is excellently defined (at  $1.0 \sigma$ ) which stands in contrast to the sulfanylmethyl group of the original Cys158. This side chain is, obviously due to its flexibility, poorly defined in the electron density maps of virtually all *Z. mobilis* Tgt crystal structures determined so far. Superimposition of the apo-structures of the mutated variants and "wild type" Tgt revealed that none of the amino acid exchanges implicates any significant structural change concerning the remaining part of the protein (mean rmsd  $0.23 \text{ \AA} \pm 0.02 \text{ \AA}$ ).

Next, we analysed and compared the structures of the studied Tgt variants in complex with preQ<sub>1</sub>. In all preQ<sub>1</sub>-bound structures the ligand appears well-defined in the respective electron density map ( $|F_o| - |F_c|$ ,  $1.0 \sigma$ ). Superimposition of the structural models reveals that preQ<sub>1</sub> is identically positioned in all investigated variants including "wild type" Tgt (mean rmsd =  $0.20 \text{ \AA} \pm 0.07 \text{ \AA}$ ). Furthermore, no differences are observed with respect to the catalytic Asp280 and the conformations of amino acids known to form direct interactions with the bound preQ<sub>1</sub> ligand. The most conspicuous differences among the preQ<sub>1</sub>-bound structures concern a small cavity separating the side chains of amino acid residues 158 and 233 (Figure 12). In "wild type" Tgt this cavity harbours two well-ordered water molecules (Figure 12A) which are displaced in the Tgt(Cys158Val)·preQ<sub>1</sub> complex structure by the isopropyl side chain of Val158 (Figure 12C). In the structure of preQ<sub>1</sub>-bound Tgt(Val233Gly) this cavity is substantially widened but harbours only one well-ordered water molecule. In addition, the electron density assigned to the preQ<sub>1</sub> ligand does obviously not reflect the excellent resolution of this structure ( $1.19 \text{ \AA}$ ) (Figures 12E and 13E). This is also indicated by the mean *B*-factor of preQ<sub>1</sub> which is, in this structure, considerably elevated compared to the mean *B*-factor of the protein ( $33.0 \text{ \AA}^2$  versus  $18.6 \text{ \AA}^2$ ). In contrast, in the structures of all other preQ<sub>1</sub>-bound Tgt variants the mean *B*-factor of preQ<sub>1</sub> is only slightly higher than the mean *B*-factor of the protein (see Table 3). The structure of preQ<sub>1</sub>-bound Tgt(Cys158Val/Val233Gly) reveals that, compared to Tgt(Val233Gly), the replacement of the hydrophilic and flexible sulfanylmethyl moiety of Cys158 by the hydrophobic isopropyl of valine leads to a regeneration of order in the substrate base binding pocket. The mean *B*-factor of the bound preQ<sub>1</sub>, which is excellently defined in the electron density map, hardly differs from the mean *B*-factor of the protein ( $15.7 \text{ \AA}^2$  versus  $14.2 \text{ \AA}^2$ ). Furthermore, an

arrangement of three highly ordered water molecules is present within the spacious cavity between Val158 and Gly233 (Figure 12G).

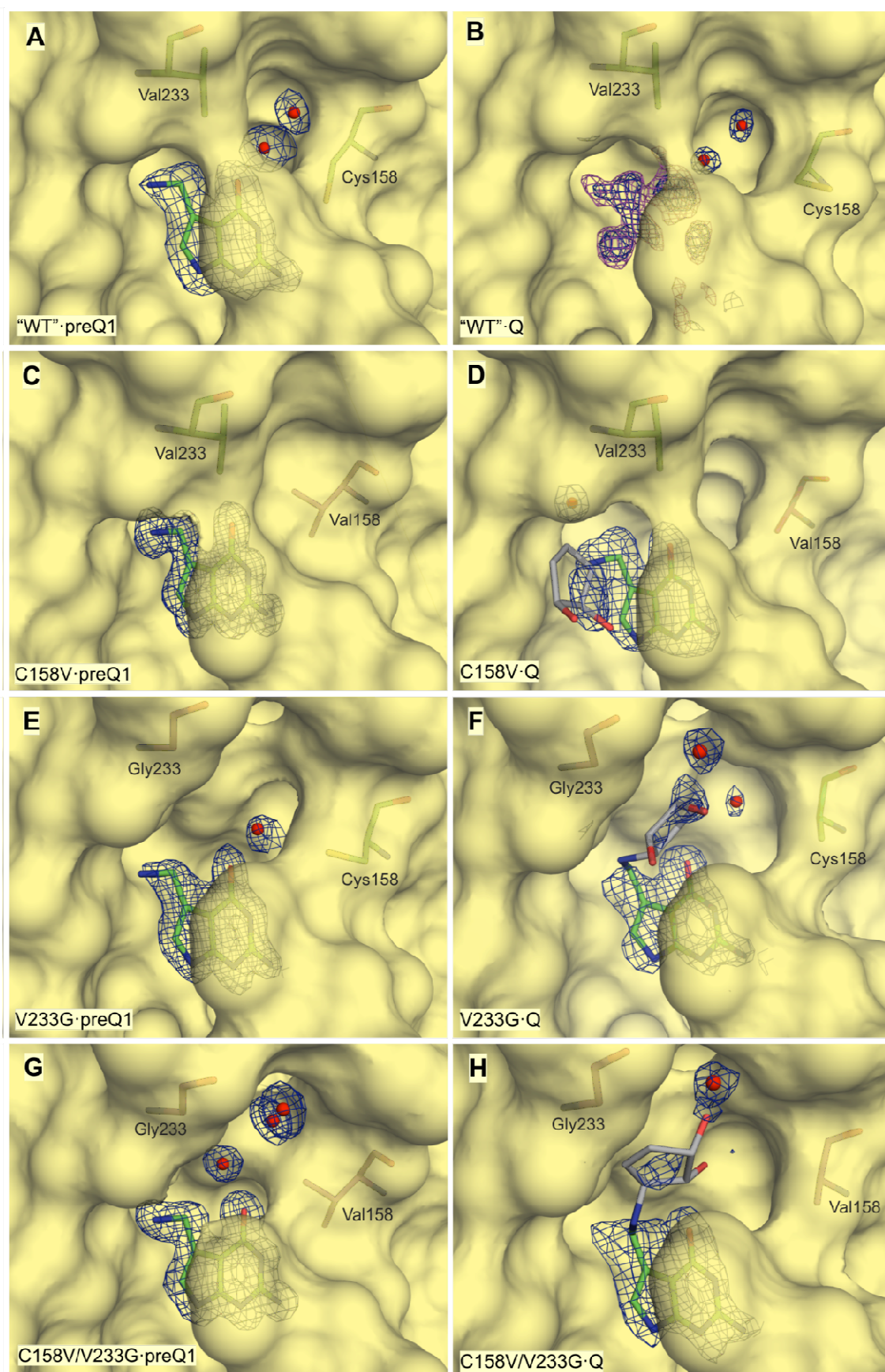
A noticeable structural change upon binding of preQ<sub>1</sub> is observed within the binding pockets of those Tgt variants which harbour the Cys158Val mutation. Both in Tgt(Cys158Val) and Tgt(Cys158Val/Val233Gly) binding of preQ<sub>1</sub> provokes a shift of Val158 towards the ligand enabling Van-der-Waals interactions of its isopropyl side chain with the 7-deazaguanine scaffold of preQ<sub>1</sub>. In addition, a conspicuous conformational change of the proximate Thr159 is observed whose side chain is rotated by about 90° (Figure 14A). So far, in no other crystal structure of *Z. mobilis* Tgt or any variant thereof such a conformational change of Thr159 has been observed upon ligand binding. To obtain evidence if the reduced affinity of Tgt(Cys158Val) and Tgt(Cys158Val/Val233Gly) towards preQ<sub>1</sub> arises from the described structural changes we determined the crystal structure of Tgt(Cys158Val) in complex with guanine. If the observed conformational rearrangements actually account for the decrease in affinity to preQ<sub>1</sub> we expected them to not occur upon guanine binding since the Cys158Val exchange has no measurable impact on guanine recognition. The crystal structure of the Tgt(Cys158Val)-guanine complex reveals that upon guanine binding the side chain of Val158 becomes largely disordered as it is ill-defined in the electron density map. The position of the main chain atoms of Val158 indicates that there is hardly any shift of this residue towards the ligand. Strikingly, no change of the Thr159 side chain conformation is observed which closely resembles that of the apo-structure (Figure 14B). We would like to note that binding of guanine leads in Tgt(Cys158Val), as in wild type Tgt, to a Leu231/Ala232 peptide bond conformation which is flipped compared to the preQ<sub>1</sub>-bound situation [Tidten et al. 2007]. In the preQ<sub>1</sub>-bound enzyme the carbonyl group of this peptide bond is exposed to the binding pocket while the backward-oriented amide forms an *H* bond to the deprotonated side chain carboxyl of Glu235. In contrast, upon guanine binding the *NH*-group of this peptide bond is exposed while the backward-oriented carbonyl oxygen interacts with the protonated Glu235 side chain carboxyl group (see also section 1.6, figure 3). Ultimately, we determined the crystal structures of the studied Tgt variants in complex with Q. Although electron density attributable to a bound ligand is clearly present in the binding pocket of the refined structure of "wild type" Tgt crystallised in presence of Q it turned out too ill-defined to allow for the definite placement of Q in the model (Figures 13B and 15B). In contrast, the electron density map of the Tgt(Cys158Val)-Q complex structure allowed the placement of

the 7-deazaguanine scaffold and the exocyclic aminomethyl group of Q. Clearly, this part of the ligand shows, as expected, a binding mode which strongly resembles that of preQ<sub>1</sub> (Figures 13D and 15D). Only rudimentary density, however, is visible for the dihydroxy-cyclopentenyl moiety of Q probably due to its enhanced residual mobility. Yet, the position of the aminomethyl group implicates the dihydroxy-cyclopentenyl pointing towards the uracil 33 nucleotide subpocket of the enzyme. This leads, compared to the preQ<sub>1</sub>-bound situation, to the displacement of a water molecule which forms an *H* bond to the exocyclic amino group of preQ<sub>1</sub>. This water is strictly conserved in the preQ<sub>1</sub> complex structures of all investigated Tgt variants and designated "W" in Figures 15A, 15C, 15E and 15G. Superimposition of the Q-bound Tgt(Cys158Val) structure with the structure of Tgt in complex with RNA [Xie et al. 2003] reveals that in the present conformation the dihydroxy-cyclopentenyl moiety of Q sterically interferes with the ribose of the uracil 33 nucleotide and the phosphate at position 34. Hence, binding of Q in the observed conformation is obviously not compatible with binding of a tRNA substrate. Notably, the presence of Q in the substrate pocket of Tgt(Cys158Val) apparently leads to a complete disorder of the Val158 side chain as there is no electron density assignable to this isopropyl moiety (Figure 15D). In contrast, this side chain is excellently defined in the electron density maps of apo- and preQ<sub>1</sub>-bound Tgt(Cys158Val) and Tgt(Cys158Val/Val233Gly). The positioning of the Val158 main chain atoms, however, suggests a significant shift of this residue towards the bound ligand although less pronounced as observed in the preQ<sub>1</sub> complex structure of Tgt(Cys158Val). In agreement with the structure of guanine-bound Tgt(Cys158Val), this shift is not concomitant with a rotation of the Thr159 side chain (Figure 14C). Also the electron density maps of the Tgt(Val233Gly)·Q and Tgt(Cys158Val/Val233Gly)·Q complex structures enabled reliable placement of the 7-deazaguanine scaffold of the ligand which is, in both cases, similarly bound as in the Tgt(Cys158Val)·Q complex. In both maps fragmentary density is visible for the dihydroxy-cyclopentenyl substituent (Figures 13F, 13H as well as 15F, 15H). Figures 13F and 13H show that the mutation of Val233 to glycine results in a considerable gain of space in the substrate binding pocket which allows the dihydroxy-cyclopentenyl of Q to occupy the cavity located between Gly233 and the side chain of Cys/Val158. Within this cavity it apparently forms no specific interaction with the protein. As a consequence, it seems to be highly flexible which is reflected by the ill-defined electron density assigned to this moiety in both structures. As in the structure of Q-bound Tgt(Cys158Val), also in the

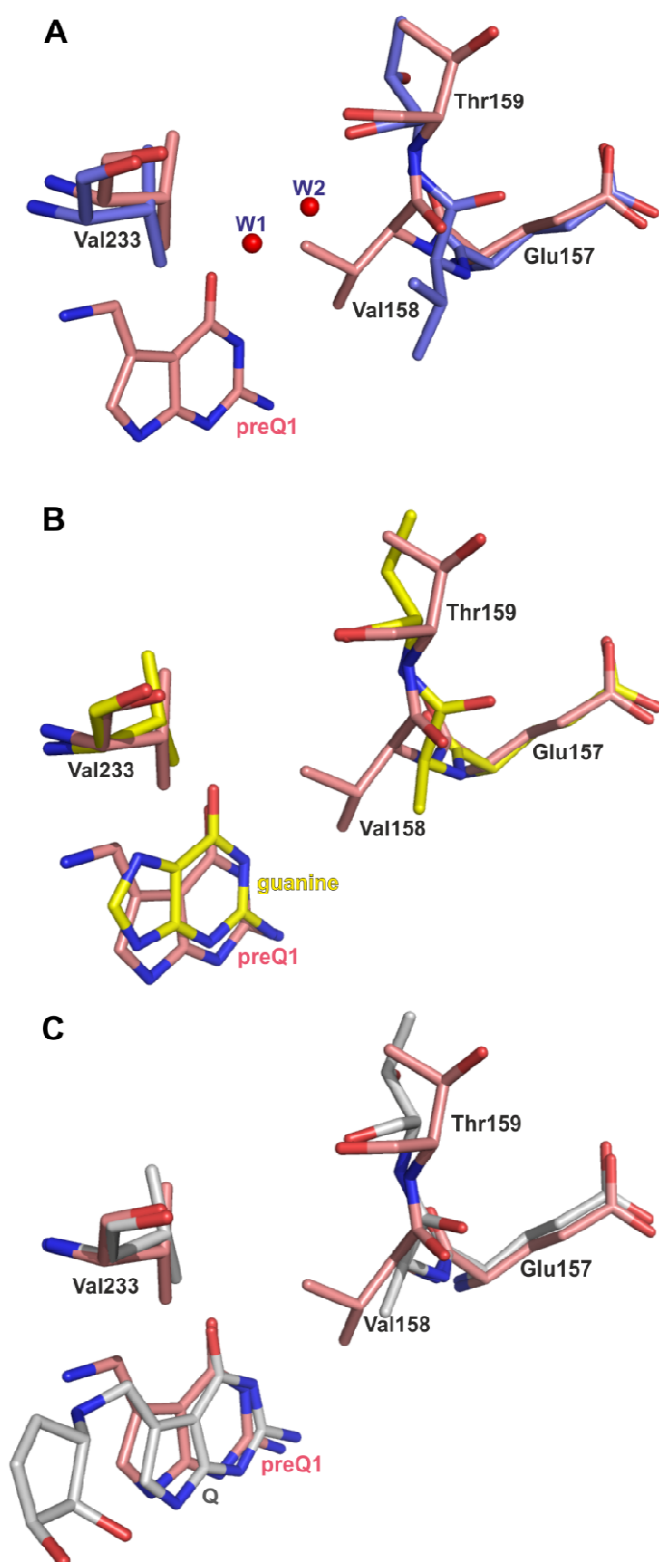
Tgt(Cys158Val/Val233Gly)·Q complex structure nearly no electron density can be attributed to the side chain of Val158 indicating an increased mobility of this residue upon binding of Q. Also in agreement with the structure of Q-bound Tgt(Cys158Val), the positioning of the Val158 main chain atoms suggests a shift of this residue towards the ligand which is not concomitant with a rotation of the Thr159 side chain. It must be noted that in case of all Q complex structures determined in this study the electron density assigned to the 7-deazaguanine scaffold of the ligand by far does not comply with the nominal resolution of the respective structure. Even in case of the mutated variants where reliable placement of the scaffold into the binding pocket was possible the electron density within this area appears rather fuzzy or even patchy and poor of any details. Probably, multiple conformations and the low occupancy (in average 60 %) of Q in the binding pocket caused the bad fuzzy shaped electron density ( $|F_o| - |F_c|$ , 1.0  $\sigma$ ).

**Figure 12.** Crystal structures of Tgt variants in complex with preQ<sub>1</sub> or Q: surface representation of substrate base binding pockets.

The solvent accessible surfaces of active sites from *Z. mobilis* Tgt variants are shown in bright yellow. The respective Tgt variant plus the bound ligand (shown in stick representation) are indicated in each sub-figure. Also amino acid residues at positions 158 and 233 are shown in stick representation. Carbon atoms of original amino acids are coloured green, those of mutated amino acids magenta. Selected water molecules are shown as red spheres. Electron density is shown for the bound ligand and water molecules.  $2|F_o| - |F_c|$  electron density contoured at a  $\sigma$  level of 1.0 is coloured blue,  $|F_o| - |F_c|$  electron density contoured at a  $\sigma$  level of 2.5 is coloured magenta. An overview of the crystal structures analysed in this study including resolutions and PDB codes is given in Table S2.







**Figure 14.** Superimposition of preQ<sub>1</sub>-bound Tgt(Cys158Val) with its apo-, its guanine- and its Q-bound form.

Carbon atoms of the Tgt(Cys158Val)·preQ<sub>1</sub> complex are coloured pink in all sub-figures. (A) Superimposition of preQ<sub>1</sub>-bound Tgt(Cys158Val) and apo-Tgt(Cys158Val). Carbon atoms of apo-Tgt(Cys158Val) are coloured blue. Binding of preQ<sub>1</sub> to Tgt(Cys158Val) provokes a shift of Val158 towards the ligand leading to the displacement of two water molecules (W1 and W2; shown as red



spheres) which are present within this region in apo-Tgt(Cys158Val). In addition, the side chain of the proximate Thr159 rotates by about 90°. Exactly the same structural changes upon binding of preQ<sub>1</sub> are observed for Tgt(Cys158Val/Val233Gly). (B) Superimposition of preQ<sub>1</sub>-bound Tgt(Cys158Val) and guanine-bound Tgt(Cys158Val). Carbon atoms of the Tgt(Cys158Val)·guanine complex are coloured yellow. In the Tgt(Cys158Val)·guanine complex, the side chain of Val158 becomes largely disordered. The Thr159 side chain adopts a similar conformation as observed in the apo-structure. (C) Superimposition of preQ<sub>1</sub>-bound Tgt(Cys158Val) and Q-bound Tgt(Cys158Val). Carbon atoms of the Tgt(Cys158Val)·Q complex are shown in grey. Binding of Q obviously leads to disordering of the Val158 side chain as no electron density attributable to this isopropyl moiety is present in the electron density map of the refined Tgt(Cys158Val)·Q complex structure. Also upon binding of Q no conformational change of the Thr159 side chain is observed. It adopts a similar conformation as in the apo- and guanine-bound structures.

## 2.4 Discussion

While eucaryotic Tgt exchanges the genetically encoded guanine by queuine (Q) at position 34 of tRNAs<sup>His,Tyr,Asp,Asn</sup>, bacterial Tgt is not able to insert the latter hypermodified base into these tRNAs. Instead, it uses the Q-precursor preQ<sub>1</sub> as a substrate which is then further converted to the final Q base at the tRNA level. A homology model of the *C. elegans* Tgt catalytic subunit suggests that the exchange of Cys158 and Val233 in bacterial Tgt (*Z. mobilis* Tgt numbering) by valine and glycine, respectively, in eucaryotic Tgt largely accounts for the difference in substrate specificity between the Tgt enzymes of both domains of life [Romier et al. 1997]. This assumption was corroborated by a homology model of the human Tgt catalytic subunit created in the present study. The replacement of Val233 by glycine results in a considerable gain of space in the substrate binding pocket most probably required for accommodation of the dihydroxy-cyclopentenyl moiety of Q. The side chain of the valine residue corresponding to Cys158 of *Z. mobilis* Tgt appears at a position where it is likely to form an interaction with the dihydroxy-cyclopentenyl substituent. While Cys158 and Val233 are highly conserved in bacterial Tgt, the corresponding valine and glycine residues are invariant in all eucaryotic Tgt catalytic subunits whose sequences have been determined so far [Thomas et al. 2011]. Based on the homology models of the *C. elegans* and human Tgt catalytic subunits, we replaced, *via* site-directed mutagenesis, Val233 and Cys158 in *Z. mobilis* Tgt by glycine and valine, respectively. In addition, to separately investigate the influence of these amino acid exchanges on substrate specificity and catalysis, we created two further variants, each containing solely one of the two mutations. However, the introduced changes aimed at converting substrate selectivity of bacterial towards eucaryotic

Tgt did not result in an enzyme able to insert Q into tRNA. Rather, the amino acid exchanges mainly interfere with catalysis by reducing  $k_{\text{cat}}(\text{guanine})$  and  $k_{\text{cat}}(\text{preQ}_1)$ . While the reduction is at the border of significance for Tgt(Cys158Val) (2- to 3-fold), it accounts for one order of magnitude for Tgt(Val233Gly) and to two for Tgt(Cys158Val/Val233Gly). The crystal structures of these Tgt variants, each determined in complex with the substrate base preQ<sub>1</sub>, do not help to provide a straight-forward explanation for the decreased catalytic activities. In each case, preQ<sub>1</sub> is identically positioned within the variant as in the wild type ruling out a substrate misorientation with respect to any catalytically relevant residue. Supposedly, the reduced catalytic activities result from complex changes of the dynamic properties of protein, substrate and involved water. A notable consequence of the Cys158Val exchange is a significantly decreased affinity of the enzyme towards preQ<sub>1</sub> but not guanine. A similar phenomenon was reported by Chen *et al.* [Chen et al. 2011] who mutated the corresponding cysteine of *E. coli* Tgt to valine resulting in a dramatical loss of affinity to preQ<sub>1</sub>. Consistently, a measurable gain in preQ<sub>1</sub> affinity was observed by this group for the human enzyme upon mutation of the corresponding Val161 to cysteine. The study does, however, not provide any data demonstrating the impact of these mutations on guanine as a substrate. As already proposed by Chen *et al.* [Chen et al. 2011], it seems likely that, in eucaryotes, a valine at the mentioned position in the catalytic subunit of eucaryotic Tgt preferably prevents the (irreversible!) insertion of preQ<sub>1</sub> into tRNA. Our data provide evidence that this is achieved without loss of affinity towards guanine which, most likely, would result in an attenuated affinity to the unmodified substrate tRNAs comprising guanine at position 34. The crystal structures of Tgt(Cys158Val) and Tgt(Cys158Val/Val233Gly), each in complex with preQ<sub>1</sub>, reveal a shift of Val158 towards the ligand compared to the corresponding apo-forms. This allows the isopropyl side chain of this residue to form Van-der-Waals contacts to the substrate. This structural change is concomitant with a 90° rotation of the Thr159 side chain thus resulting in a novel conformation so far not observed in any other crystal structure of *Z. mobilis* Tgt or a mutated variant thereof. The crystal structure of Tgt(Cys158Val) in complex with guanine reveals that there is no conformational change of Thr159 upon guanine binding. Obviously, the Thr159 conformational change is triggered by preQ<sub>1</sub> and not by guanine. This observation is the more remarkable as the Thr159 side chain remains at large distance without any direct contact to the aminomethyl group of preQ<sub>1</sub>. The *Penultimate Rotamer Library* published by Lovell et al. 2000 reports three preferred rotamers for

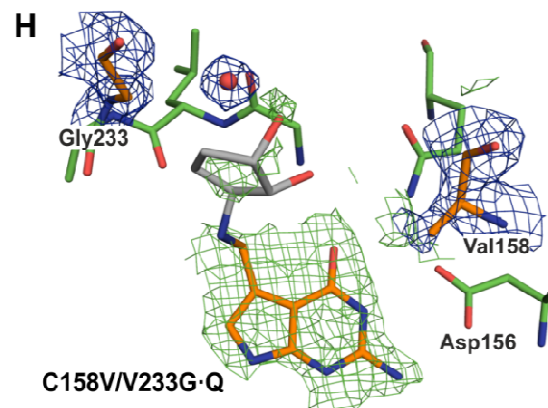
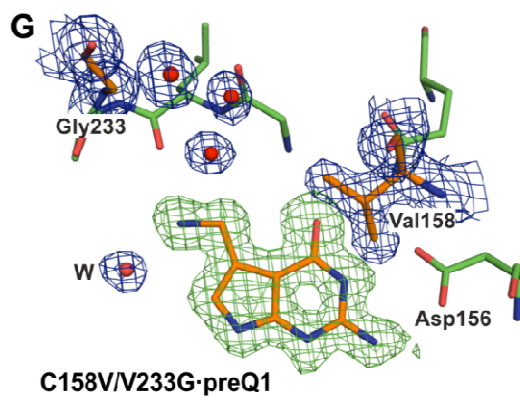
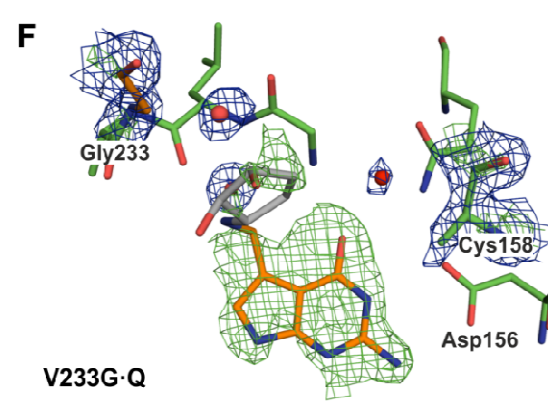
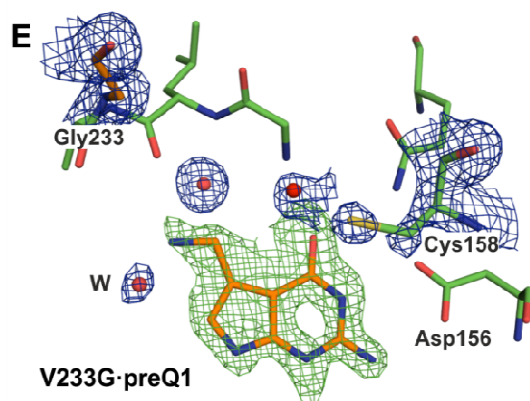
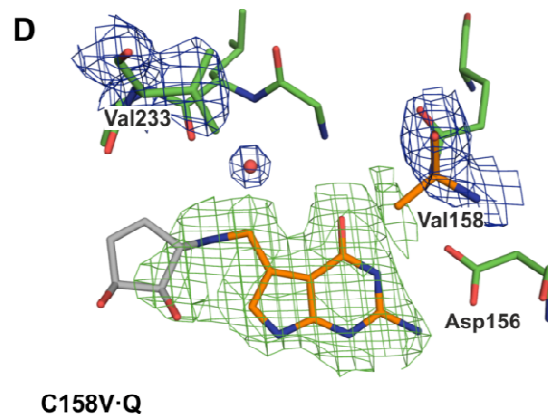
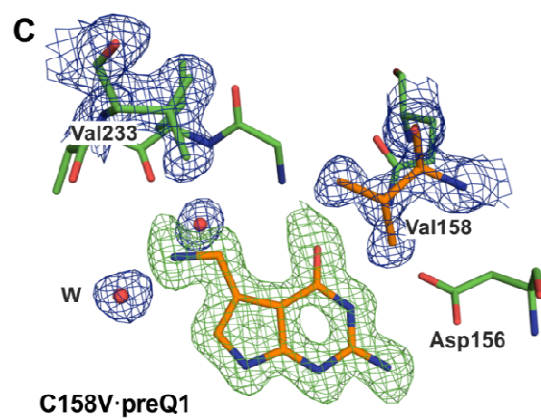
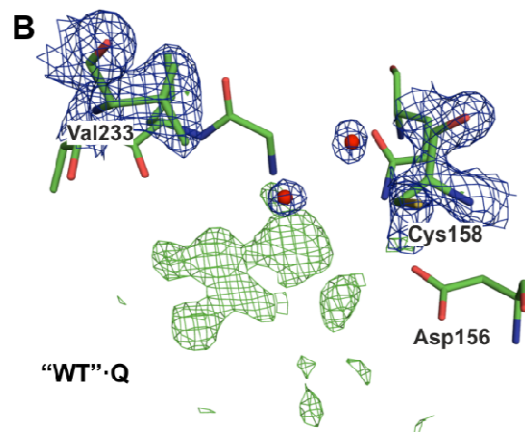
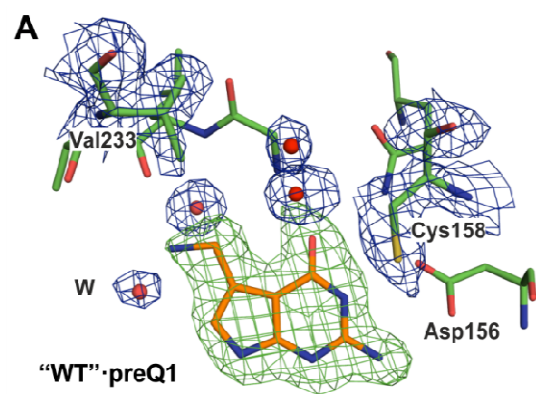
threonine observed with a relative frequency of 7 %, 43 %, and 49 %. Notably, in the preQ<sub>1</sub> complexes of Tgt(Cys158Val) and Tgt(Cys158Val/Val233Gly) Thr159 adopts the least populated conformer, which probably corresponds to the energetically least favourable rotamer. In contrast, the Thr159 side chain conformation observed in all other crystal structures of *Z. mobilis* Tgt matches with the rotamer found with a frequency of 43 %. Accordingly, the side chain conformation of Thr159 induced upon preQ<sub>1</sub> binding may well be correlated with the reduced preQ<sub>1</sub> affinity observed upon Cys158Val mutation. It should be noted, that Thr159 is in most eucaryotic Tgt catalytic subunits replaced by a nearly isosteric valine residue [Thomas et al. 2011]. As neither *Z. mobilis* Tgt nor any of our mutated variants are able to use Q base as a substrate we investigated whether Q is actually recognised by these enzymes. For that purpose, we tested if Q was able to act as inhibitor of bacterial Tgt since its binding to the active site should inevitably prevent radiolabelled guanine from being inserted into tRNA. Indeed, a considerable inhibitory effect of Q on Tgt activity is observed for all investigated enzyme variants including "wild type" Tgt. Recognition of the Q base in the substrate binding pocket of "wild type" Tgt and Tgt(Cys158Val) seems surprising as these variants do not exhibit the space-opening Val233Gly exchange believed to be prerequisite for accommodation of the dihydroxy-cyclopentenyl side chain of Q. Trapping experiments revealed that Q acts on all studied Tgt variants predominantly as a competitive inhibitor with respect to tRNA as substrate. This means Q binds to the respective apo-enzymes but hardly to the covalent enzyme-tRNA complexes formed upon release of guanine. Solely in case of Tgt(Cys158Val/Val233Gly), the variant that should best approach the eucaryotic enzyme, the result of the trapping experiment indicates that the covalent enzyme-tRNA complex may, though to a low extent, be capable of Q binding. The crystal structure of Tgt(Cys158Val) in complex with Q provides an evident explanation why this variant is exclusively in its apo-form able to bind Q. The bulky side chain of Val233 does not prevent Q from binding to the active site. Yet, it forces its dihydroxy-cyclopentenyl moiety into a position which is not compatible with tRNA binding due to clashes with the tRNA sugar phosphate backbone. The same is likely to hold true for "wild type" Tgt although ill-defined electron density in this crystal structure does not allow reliable placement of Q into the substrate binding pocket of the refined model. The crystal structures of Tgt(Val233Gly) and Tgt(Cys158Val/Val233Gly) with Q reveal that the Val233Gly exchange allows the dihydroxy-cyclopentenyl substituent to occupy the created cavity between position 233 and 158. The

adopted binding mode of Q will not interfere sterically with the sugar-phosphate backbone of bound tRNA. Yet, the results of the trapping experiment suggest that also Tgt(Val233Gly) is not and Tgt(Cys158Val/Val233Gly) only minor able to bind Q after formation of the covalent enzyme-tRNA complex. The fuzzy electron density corresponding to the bound Q base suggests high residual ligand flexibility accompanied by significant disorder induced in the active sites of the studied Tgt variants. The latter becomes evident from elevated *B*-factors and ill-defined electron density of residues next to the substrate binding pocket. Possibly, the enhanced mobility of the substrate binding pocket and the bound Q in these complexes is not compatible with the constrictions induced by the formation of the covalent enzyme-tRNA complex. In any case, the fact that Q seems to be in no case efficiently bound to this covalent complex provides a plausible explanation why it does not constitute a substrate. Comparison of the active centre of *Z. mobilis* Tgt with the modelled human Tgt catalytic subunit reveals that Ala232 adjacent to Val233 in the bacterial enzyme is replaced by a serine (Ser231) in human Tgt (Figure 10). This residue is involved in a peptide switch necessary to accommodate preQ<sub>1</sub> after the excised guanine 34 has left the binding pocket [Tidten et al. 2007] (section 1.6, figure 3). Although the main chain amide of Ala232 binds indirectly, *via* a water molecule, to N7 of guanine 34 its side chain methyl group forms no interaction with any substrate. Therefore, and since this residue is replaced by a serine in many bacterial Tgts too, it seems unlikely to contribute to substrate specificity or catalytic activity. Nevertheless, we introduced the Ala232Ser mutation into Tgt(Cys158Val/Val233Gly) to investigate its impact. For comparison, the Ala232Ser mutation was also introduced into "wild type" Tgt. Kinetic measurements showed that the Ala232Ser conversion further reduced catalytic activity of Tgt(Cys158Val/Ala232Ser/Val233Gly). The residual turnover observed for this variant both with guanine and preQ<sub>1</sub> as substrate was too small to allow for the determination of reliable Michaelis-Menten parameters due to the low signal to noise ratio of the measured data. Interestingly, also a pronounced 100-fold decrease in  $k_{\text{cat}}$  compared to "wild type" Tgt was observed for Tgt(Ala232Ser) for guanine and preQ<sub>1</sub> as a substrate (data not shown). Accordingly, the Ala232Ser variants of Tgt were not considered further in this study. In addition, crystal structures determined of Tgt(Cys158Val/Ala232Ser/Val233Gly) in its apo-form, in complex with preQ<sub>1</sub> and in complex with Q do not show any significant differences to the corresponding ones of Tgt(Cys158Val/Val233Gly) and, due to redundancy will not be discussed in detail.

Nevertheless, it is worth to mention that in the Tgt(Cys158Val/Ala232Ser/Val233Gly)·preQ<sub>1</sub> complex the above-mentioned side chain rotation of Thr159 thought to correlate with the Cys158Val mutation upon binding of preQ<sub>1</sub> is also observed. Consistent with previously discussed results, this conformational change is not visible in the structure of this variant in complex with Q.

**Figure 13.** Crystal structures of Tgt variants in complex with preQ<sub>1</sub> or Q: stick representation of the substrate pockets.

The respective Tgt variant plus the bound ligand are indicated in each sub-figure. Carbon atoms of original amino acids are coloured green, those of mutated amino acids as well as of the bound ligand orange. Selected water molecules are shown as red spheres. Electron density is shown for amino acid residues at positions 158 and 233 as well as for the ligand and for water molecules. The  $2|F_o|-|F_c|$  electron density map contoured at a  $\sigma$  level of 1.0 is coloured blue. The green density represents an  $|F_o|-|F_c|$  omit map (map excluding the ligand coordinates from the refinement to test the quality of the ligand electron density) contoured at  $2.5\sigma$ . An overview of the crystal structures analysed in this study including nominal resolutions and PDB codes is given in Table S2.



## 2.5 Materials and methods

### 2.5.1 Homology modelling

The crystal structure of *Z. mobilis* Tgt was used as a template to create a model of the human Tgt catalytic subunit. Amino acid sequences were extracted from the deposited *Z. mobilis* Tgt crystal structures with PDB codes: **1r5y** (chain A), **1y5v** (chain A), **1y5w** (chain A), **1ozm** (chain A), **1ozq** (chain A), and **1q2r** (chain A and B, respectively). These sequences were aligned with the human Tgt sequence (catalytic subunit) from UniProtKB/Swiss-Prot [Boeckmann et al. 2003] (accession code Q9BXR0) using ClustalW 1.83 [Chenna et al. 2003]. The sequences aligned with 42 % identity. Based on the alignment, ten homology models for human Tgt were calculated with MODELLER 6a [Eswar et al. 2000]. As no significant differences were apparent, the model with the lowest MODELLER target function value (11,429.19) was selected as representative.

### 2.5.2 Cloning and Tgt preparation

Site-directed mutagenesis was performed using the QuickChange™ kit (Stratagene) following the vendor's protocol. The oligonucleotides listed in Table 4 were used to introduce the mutations into the *Z. mobilis* *tgt*(Tyr106Phe) expression plasmid pET9d-ZM-Y106F [Brenk et al. 2003]. Sequence analysis of the entire *tgt* gene (MWG Biotech, Ebersberg) confirmed in each case the presence of the desired mutation(s) as well as the absence of any further unwanted mutation. Subsequently, the mutated plasmids were transformed into *E. coli* BL21(DE3)/pLysS cells. These cells were used for the preparation of the mutated Tgt variants following the protocol of Romier et al. [1996a].

mutation/name of oligo	sequence (5' to 3')
C158V-f	5'-GTA ATG GCC TTT GAC GAA <b>GTC</b> ACG CCT TAT CCA GC-3'
C158V-b	5'-GC TGG ATA AGG CGT <b>GAC</b> TTC GTC AAA GGC CAT TAC-3'
V233G-f	5'-GCT GTT GGG GGA TTG GCT <b>GGG</b> GGT GAA GGA CAG GAT G-3'
V233G-b	5'-C ATC CTG TCC TTC ACC <b>CCC</b> AGC CAA TCC CCC AAC AGC-3'
A232S-f	5'-GCT GTT GGG GGA TTG <b>TCT</b> GTG GGT GAA GGA CAG GAT G-3'
A232S-b	5'-C ATC CTG TCC TTC ACC CAC <b>AGA</b> CAA TCC CCC AAC AGC-3'
A232S-V233G-f	5'-GCT GTT GGG GGA TTG <b>TCT</b> <b>GGG</b> GGT GAA GGA CAG GAT G-3'

mutation/name of oligo	sequence (5' to 3')
A232S-V233G-b	5'-C ATC CTG TCC TTC ACC CCC AGA CAA TCC CCC AAC AGC-3'

**Table 4.** Oligonucleotides used in mutagenesis.

### 2.5.3 Preparation of *Escherichia coli* tRNA<sup>Tyr</sup>

Preparation of unmodified *E. coli* tRNA<sup>Tyr</sup> (ECY2) [Curnow *et al.* 1993] *via in vitro* transcription was done using the RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7 (Promega) according to the vendor's protocol. The concentration of tRNA was determined *via* UV photometry ( $\lambda = 280$  nm).

### 2.5.4 Preparation of preQ<sub>1</sub> and Q

Preparation of preQ<sub>1</sub> and Q was carried out according to Gerber & Klebe [2012].

### 2.5.5 Determination of kinetic parameters

Progress curves of Tgt activity using guanine and tRNA<sup>Tyr</sup> as substrates were measured by monitoring incorporation of radiolabelled guanine into tRNA<sup>Tyr</sup>. The reaction proceeded at 37°C in 75  $\mu$ L solutions containing 150 nmol·L<sup>-1</sup> (of monomer) *Z. mobilis* Tgt [300 nmol·L<sup>-1</sup> in case of Tgt(Cys158Val/Val233Gly)] and variable concentrations of *E. coli* tRNA<sup>Tyr</sup> and guanine (7.5 % [8-<sup>3</sup>H]-guanine; 12 Ci/mmol, Hartmann Analytic). The assay was performed in 200 mmol·L<sup>-1</sup> HEPES buffer pH 7.3, 20 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, and 0.037 % (v/v) Tween 20 (Roth). Reactions were started by adding tRNA and [8-<sup>3</sup>H]-guanine to the protein solution. To allow the protein solution to adjust to assay temperature it was pre-incubated at 37°C for 10 min prior to substrate addition. After the reactions were started, 15  $\mu$ L aliquots were taken at intervals of 1 to 4 min. Aliquots were immediately transferred to Whatman GC-F glass microfiber filters (GE Healthcare) and quenched with 10 % (w/v) trichloroacetic acid at 0°C for 15 min. Unbound guanine was washed from the filters in 7 min intervals twice with 5 % (w/v) trichloroacetic acid and twice with technical grade ethanol. Filters were dried at 60°C for 45 min. <sup>3</sup>H incorporated into tRNA was quantified using liquid scintillation counting.



Results from the aliquots were used to calculate initial velocity using GraFit (V. 4.09; Erithacus Software Ltd., 1999).

Michaelis-Menten parameters for tRNA and guanine were determined separately in duplicate and average values were calculated. Kinetic parameters for guanine were measured using  $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  tRNA<sup>Tyr</sup> and concentrations of  $[8\text{-}^3\text{H}]\text{-guanine}$  varying in the range of  $0.5 - 20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Kinetic parameters for tRNA were measured using  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $[8\text{-}^3\text{H}]\text{-guanine}$  and tRNA<sup>Tyr</sup> concentrations varying in the range of  $0.25 - 15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Initial velocities in "counts per min" were transferred to  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  using a calibration constant derived from liquid scintillation counting of  $[8\text{-}^3\text{H}]\text{-guanine}$  solutions with variable concentrations. Kinetic parameters were determined *via* double-reciprocal linearisation and linear regression using GraFit. Michaelis-Menten parameters for preQ<sub>1</sub> were determined in the same manner as for guanine but using radiolabelled preQ<sub>1</sub> ([methylene-<sup>3</sup>H]-7-aminomethyl-7-deazaguanine = [<sup>3</sup>H]-preQ<sub>1</sub>; 7.0 Ci/mmol, Moravek Biochemicals Inc., California, USA) as substrate base. The concentration of preQ<sub>1</sub> was varied between  $0.5 - 15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  for "wild type" Tgt and Tgt(Val233Gly) or rather  $1 - 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  for Tgt(Cys158Val) and Tgt(Cys158Val/Val233Gly). In the same manner, enzymatic activity was analysed using [<sup>3</sup>H]-Q (7.0 Ci/mmol, Moravek Biochemicals Inc., California, USA) as substrate base at concentrations of up to  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Alternatively, enzymatic activity with Q as substrate base was measured *via* monitoring the removal of  $[8\text{-}^3\text{H}]\text{-guanine}$  from tRNA<sup>Tyr</sup> radiolabelled in position 34 as described in [Tidten et al. 2007] but with the substrate base preQ<sub>1</sub> replaced by Q. Radiolabelled tRNA<sup>Tyr</sup> was used in a concentration of  $8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . The concentration of Q amounted to  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  for all inspected Tgt variants.

### 2.5.6 Determination of inhibition constants

Inhibition constant of Q base (competitive against tRNA) was determined for "wild type" Tgt and mutated variants as described by Meyer *et al.* [2006].

### 2.5.7 SDS-PAGE trapping experiment

$5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  *Z. mobilis* Tgt (monomer),  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  *E. coli* tRNA<sup>Tyr</sup> (ECY2) and, if necessary,  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  of Q base or rather 2,6-diamino-3H-quinazolin-4-one in  $10 \mu\text{L}$  of  $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

HEPES buffer, pH 7.3, 20 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, and 5 mmol·L<sup>-1</sup> dithiothreitol were incubated for 1 h at 25°C. A total of 10 µL of SDS loading buffer [250 mmol·L<sup>-1</sup> TrisHCl pH 6.8, 8 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) Glycerol, 0.04 % (w/v) bromophenol blue, 8 % (v/v) 2-sulfanylethanol] was added and incubated for another hour at 25°C to allow proper unfolding. 10 µL of each sample were then loaded onto a 15 % SDS polyacrylamide gel and electrophoresis was performed with SDS running buffer [25 mmol·L<sup>-1</sup> TrisHCl pH 8.8, 200 mmol·L<sup>-1</sup> glycine, 0.1 % (w/v) SDS]. Gels were stained with Coomassie® brilliant blue R-250 (Bio-RAD).

## 2.5.8 Microscale thermophoresis measurements

*Z. mobilis* Tgt at a concentration of 10 µmol·L<sup>-1</sup> was labelled with Alexa Fluor®647 succinimidyl ester at a concentration of 40 mg·L<sup>-1</sup> at room temperature for 30 min in a 500 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl solution buffered with 50 mmol·L<sup>-1</sup> HEPES pH 8.1 (molar dye : protein ratio ≈ 3 : 1). Excessive unreacted Alexa Fluor®647 was removed with a NAP5 sephadex column (GE Healthcare) equilibrated with 2 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, 1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA solution buffered with 10 mmol·L<sup>-1</sup> TrisHCl pH 7.8. Photometry at 650 nm and 280 nm indicated a label: protein ratio of 0.8. The Alexa Fluor®647-Tgt solution was adjusted to 100 nmol·L<sup>-1</sup> with 100 mmol·L<sup>-1</sup> HEPES pH 7.3 buffer containing 20 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> and 0.037 % (v/v) (≡ 323 µmol·L<sup>-1</sup>) Tween 20 (Roth). The final solution contained NaCl at a concentration of approximately 300 mmol·L<sup>-1</sup>. The tRNA<sup>Tyr</sup> ligand was dissolved in the same buffer (free of NaCl) at a concentration of 10 µmol·L<sup>-1</sup>. A series of fifteen 1 : 1 dilutions of tRNA<sup>Tyr</sup> solution : buffer solution was prepared producing tRNA<sup>Tyr</sup> concentrations ranging from 305 pmol·L<sup>-1</sup> to 10 µmol·L<sup>-1</sup>. For thermophoresis, each of these solutions was mixed with one volume of Alexa Fluor®647-Tgt solution resulting in a constant concentration of fluorescence labelled Tgt of 50 nmol·L<sup>-1</sup> and tRNA<sup>Tyr</sup> concentrations ranging from 153 pmol·L<sup>-1</sup> to 5 µmol·L<sup>-1</sup>. After 10 min incubation followed by centrifugation at 10 000 × g for 10 min, approximately 2 µL of each solution were filled into Monolith NT Standard treated capillaries (NanoTemper Technologies GmbH). Thermophoresis (including temperature jump) was measured at room temperature for 10 s by means of a Monolith NT.015 instrument (NanoTemper Technologies GmbH), using 100 % LED power and 60 % infrared laser power. Data of three independent runs were averaged and analysed using Origin 7 (Origin Lab). Curve fitting and *K<sub>D</sub>* calculation was done using the

program NanoTemper Analysis 1.2.009 (NanoTemper Technologies GmbH) based on the following equation [Wienken et al. 2010]:

$T$  = thermophoresis signal

$U$  = minimal signal (unbound protein)

$B$  = maximal signal (protein saturated with ligand)

$c_p$  = concentration of labelled protein

$c_i$  = concentration of ligand

$K_D$  = dissociation constant

$$T = U + (B - U) \cdot \frac{(c_p + c_i + K_D) - \sqrt{(c_p + c_i + K_D)^2 - 4 \cdot c_p \cdot c_i}}{2 \cdot c_p}$$

### 2.5.9 Crystallisation, data collection, and processing

Crystals of the investigated Tgt variants suitable for ligand soaking were grown *via* the hanging-drop vapour diffusion method. Droplets were prepared by mixing 1  $\mu$ L of concentrated protein solution (12 to 15  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  in 2  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl, 10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris/HCl pH 7.8, 1  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA, 1  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DTT) with 1  $\mu$ L reservoir solution (11 % (w/v) PEG 8,000, 100  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris/HCl, pH 8.5, 1  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DTT, 10 % (v/v) DMSO). Crystals grew within one week at 18°C in the presence of 1.0 mL of reservoir solution. For cocrystallisation of Tgt(Cys158Val) with guanine, guanine·HCl was dissolved in DMSO and added to the crystallisation droplet to a final concentration of 5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ . As guanine is, under the above-named conditions, not soluble up to this concentration a substantial portion of the compound precipitated. Crystals grew within the guanine precipitate in two weeks. To allow cocrystallisation of the Tgt variants with Q the compound was dissolved in DMSO and added to the droplet to a final concentration of 20  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Crystals of the Tgt variants complexed to preQ<sub>1</sub> were produced by a soaking procedure. The compound was dissolved in DMSO and added to 2  $\mu$ L of reservoir solution to a final concentration of 10 to 20  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Finally, a single pre-grown Tgt crystal was transferred into the droplet which was sealed against 1.0 mL of reservoir solution and soaked for 30 min. For data collection, crystals were cryoprotected using glycerol. The glycerol and PEG 8,000 concentrations of the reservoir buffers were increased stepwise by transferring the crystals to six different 2  $\mu$ L cryodroplets

each with 30-min incubation times while sealed against 1.0 mL of the same solution (glycerol concentrations (v/v): 5 % → 10 % → 15 % → 20 % → 25 % → 30 %; and PEG 8,000 concentrations (w/v): 5.0 % → 6.3 % → 7.5 % → 8.0 % → 8.8 % → 9.8 %, respectively). These droplets also contained the ligands at the same concentrations as the soaking and cocrystallisation solutions. The cryo-soaked crystals were flash-frozen in liquid nitrogen. Data sets (**3bld**, **4dg0**, **4e2v**, **4hvx**, **4h7z**, **4h6e**, **4hsh**, **4hqv**, **4gcx** and **“WT”-Tgt-Q**) were collected at cryo conditions ( $-173^{\circ}\text{C} \equiv 100\text{ K}$ ) at the BESSY II (Helmholz-Zentrum, Berlin, Germany) beamlines BL-14.1 and BL-14.2 and with CuK $\alpha$  radiation ( $\lambda = 1.5418\text{ \AA}$ ) using a Rigaku RU-300 rotating-anode generator at 50 kV and 90 mA equipped with Xenocs focussing optics and an R-Axis IV detector. All crystals tested exhibited monoclinic symmetry in space group C2 containing one monomer per asymmetric unit with Matthews coefficients of 2.3 - 2.4. Data processing and scaling was performed using the HKL2000 package [Otwinowski and Minor 1997] except for structure **4h7z** which was processed using iMOSFLM 1.0.6 [Battye et al. 2011] and SCALA [Evans 2011]. For all refined structures unit cell dimensions for the crystals, data collection and processing statistics are given in Table 3.

Coordinates of the apo-Tgt crystal structure (PDB-code: **1pud** in case of the structures **1ozm**, and **3bl3**, **3bld**, **3blo** ) and coordinates of the Tgt in complex with 2-[(thiophen-2-ylmethyl)amino]-1,7-dihydro-8H-imidazo[4,5-g]quinazolin-8-one crystal structure (PDB-code: **3gev** in case of structures **4e2v**, **4dg0**, **4h7z**, **4h6e**, **4hqv**, **4hsh**, **4hqv**, **4gcx** and **“WT”-Tgt-Q**) were slightly modified (deletion of coordinates at the sites of mutation, water and ligand) before applying for initial rigid-body refinement of the protein molecule followed by repeated cycles of conjugate gradient energy minimisation, simulated annealing and *B*-factor refinement using the CNS program package [Brunger et al. 1998]. Refinement at the later stages was performed with SHELXL [Sheldrick and Schneider 1997] for structures **3bl3**, **3bld** and **3blo**. Here, up to 50 cycles of conjugate gradient minimisation were performed with default restraints on bonding geometry and *B*-values: 5% of all data were used for  $R_{\text{free}}$  calculation. For structures **4e2v**, **4dg0**, **4h7z**, **4h6e**, **4hqv**, **4hsh**, **4hqv**, **4gcx** and **“WT”-Tgt-Q** refinement was performed with PHENIX 1.8-1069 [Adams et al. 2010] with 5% to 10% of all data being used for  $R_{\text{free}}$  calculation and followed by repeated cycles of maximum likelihood energy minimization. For the structure **4h7z**, **4hvx**, **4hqv**, **4hsh** an additional optimization of the weights between X-ray target and stereochemistry as well as between ADP restraints was performed by PHENIX 1.8-1069 [Adams et al. 2010]. Amino acid side chains were fitted

to  $\sigma_A$ -weighted  $2|F_o| - |F_c|$  and  $|F_o| - |F_c|$  electron density maps using Coot [Emsley and Cowtan 2004]. Ligands were generated using SYBYL [SYBYL 8.0]. Afterwards, geometric restraints of the ligands were calculated by Monomer Library Sketcher (ccp4) [Collaborative Computational Project, 1994]. For structures **4e2v**, **4dg0**, **4h7z**, **4h6e**, **4hqv**, **4hsh**, **4hqv**, **4gcx** and **“WT”-Tgt-Q** water was located using the refinement settings: update waters implemented in the program PHENIX 1.8-1068 [Adams et al. 2010]. After further refinement cycles water was checked visually. Glycerol molecules and ligands were located in the difference electron density and added to the model for further refinement cycles. The temperature factors for structures **4e2v**, **4gcx**, **4gd0** and **3bld** were anisotropically refined, whereas for structures **4hvx**, **4h7z**, **4hsh**, **4hqv** and **4h6e** and **“WT”-Tgt-Q** TLS refinement was applied. The definition of the TLS groups was done with the TLSMD server [Painter and Merritt 2006]. Restraints were applied to bond lengths and angles, planarity of aromatic rings, and Van-der-Waals contacts. Multiple side-chain conformations were built in case an appropriate electron density was observed and maintained during refinement and if the minor populated side chain showed at least 20% occupancy. All final models were validated using PROCHECK [Laskowski et al. 1993]. Analysis of temperature factors was done with Moleman [Kleywegt et al. 2001].

### 2.5.10 Alignment and Figures

Alignment of structures with similar or identical sequences was performed with the alignment function implemented in PyMOL (<http://www.pymol.org>). Figures were prepared using ChemDraw Std 12.0 (PerkinElmer, Massachusetts, USA).

### 2.5.11 Protein Data Bank Accession Codes

The Protein Data Bank (PDB) accession codes allocated to the crystal structures determined in the course of this study are given in Table 3 and Table S1.

## 2.5.12 Crystallographic Tables

**Table 3A – 3D, S1/S2.** Crystallographic data collection and refinement statistics.

All mutated *Z. mobilis* Tgt variants investigated in this study contain an additional Tyr106Phe mutation (see main text).

<sup>a)</sup> number in parentheses is for highest resolution shell

<sup>b)</sup>  $R_{sym} = \frac{\sum |I - \bar{I}|}{\sum I}$ , with  $I$  representing the observed intensity and  $\bar{I}$  representing the average intensities for multiple measurements.

$$^c) R_{work} = \frac{\sum_{hkl} |F_{obs} - F_{calc}|}{\sum_{hkl} |F_{obs}|}.$$

<sup>d)</sup>  $R_{free}$  was calculated as  $R_{work}$  but on 5 % of the data excluded from the refinement.

Crystal data <sup>*</sup>	Tgt(Cys158Val)	Tgt(Cys158Val) · guanine	Tgt(Cys158Val) · preQ <sub>1</sub>	Tgt(Cys158Val) · Q
PDB ID	4gd0	4h7z	4e2v	4hvx
A. Data Collection and Processing				
Collection site	BL 14.2	BL 14.1	BL 14.2	BL 14.2
$\lambda$ (Å)	0.91841	0.91841	0.91841	0.91841
Space group	<i>C2</i>	<i>C2</i>	<i>C2</i>	<i>C2</i>
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	91.4, 65.0, 70.2	90.4, 64.8, 70.8	90.4, 64.9, 70.4	91.6, 64.5, 71.1
$\beta$ (°)	96.1	95.6	95.8	96.2
Matthews coefficient (Å <sup>3</sup> /Da)	2.4	2.4	2.4	2.4
Solvent content (%)	48.7	48.7	48.7	48.7
B. Diffraction Data				
Resolution range <sup>a</sup> (Å)	50–1.29 (1.31–1.29)	30–1.68 (1.77–1.68)	21.0–1.18 (1.2–1.18)	50–1.82 (1.85–1.82)
No. of unique reflections	102,682 (4,187)	45,941 (6,706)	132,461 (5,750)	35,405 (1,467)
Completeness <sup>a</sup> (%)	97.1 (81.5)	99.2 (99.8)	95 (88)	94.9 (78.4)
Redundancy	2.7 (1.7)	2.9 (2.8)	2.5 (2.2)	3.0 (2.2)
$R(I)_{sym}^{a,b}$ (%)	4.7 (23.3)	7.0 (48.2)	4.2 (21.8)	4.5 (36.3)
$I/\sigma(I)$ <sup>a</sup>	22.1 (3.0)	10.2 (2.1)	21.4 (4.13)	21.7 (2.2)
C. Refinement				
Program	Phenix	Phenix	Phenix	Phenix
$R_{work}^c$ / $R_{free}^d$ (%)	16.2 / 18.5	15.7 / 19.1	13.7 / 15.2	16.6 / 19.7
Protein residues	373	371	364	358
Water molecules	524	318	464	165

Ligand atoms	---	11	13	13
Ramachandran plot				
Residues in most favored regions (%)	94.4	95.5	95.3	95.4
Residues in additionally allowed regions (%)	5.0	4.2	4.4	4.3
Residues in generously allowed regions (%)	0.6	0.3	0.3	0.3
Mean $B$ -factors ( $\text{\AA}^2$ )				
Protein	12.6	15.6	13.7	28.6
Water	29.1	29.	29.2	35.8
Ligand	---	29.8	11.6	34.1
Rmsd from ideality				
rmsd angle ( $^\circ$ )	1.1	1.8	1.2	1.2
rmsd bond ( $\text{\AA}$ )	0.005	0.019	0.007	0.010

**Table 3A.** Crystallographic data collection and refinement statistics.

<b>Crystal data*</b>	Tgt(Val233Gly)	Tgt(Val233Gly) · preQ <sub>1</sub>	Tgt(Val233Gly) · Q
<b>PDB ID</b>		<b>3bld</b>	<b>4hsh</b>
<b>A. Data Collection and Processing</b>			
Collection site	BL 14.2	BL 14.2	BL 14.2
$\lambda$ ( $\text{\AA}$ )	0.91841	0.91841	0.91841
Space group	$C2$	$C2$	$C2$
$a, b, c$ ( $\text{\AA}$ )		89.7, 64.9, 70.3	90.5, 64.8, 70.5
$\beta$ ( $^\circ$ )		95.6	95.9
Matthews coefficient ( $\text{\AA}^3/\text{Da}$ )	2.4	2.4	2.4
Solvent content (%)	48.7	48.7	48.7
<b>B. Diffraction Data</b>			
Resolution range <sup>a</sup> ( $\text{\AA}$ )		50–1.19 (1.22 –1.19)	50–1.56(1.59–1.56)
No. of unique reflections		116,963 (	57,783
Completeness <sup>a</sup> (%)		91.6 (62.8)	100 (100)
Redundancy		3.7	4.2 (4.1)
$R(I)_{\text{sym}}^{a,b}$ (%)		4.1 (26.2)	8.8 (49.6)
$I/\sigma(I)^a$		21 (2.7)	15.4 (2.7)
<b>C. Refinement</b>			
Programm		ShelxL–97	Phenix
$R_{\text{work}}^c / R_{\text{free}}^d$ (%)		15.1 / 18.5	15.5 / 18.1

Protein residues		348	365
Water molecules		262	318
Ligand atoms	–	13 / 1	12 / 1
Ramachandran plot			
Residues in most favored regions (%)		95.6	95.5
Residues in additionally allowed regions (%)		4.1	4.2
Residues in generously allowed regions (%)		0.3	0.3
Mean <i>B</i> -factors (Å <sup>2</sup> )			
Protein		18.6	16.8
Water		28.4	31.9
Ligand	---	33.0	36.0
RMSD from ideality			
rmsd angle (°)		2.1	1.6
rmsd bond (Å)		0.013	0.017

**Table 3B.** Crystallographic data collection and refinement statistics.

Crystal data*	Tgt(Cys158Val/ Val233Gly)	Tgt(Cys158Val/ Val233Gly) · preQ <sub>1</sub>	Tgt(Cys158Val/ Val233Gly) · Q	"WT"– Tgt · Q
PDB ID	4h6e	4gcx	4hqv	-----
<b>A. Data Collection and Processing</b>				
Collection site	BL 14.2	BL 14.2	BL 14.2	BL 14.2
$\lambda$ (Å)	0.91841	0.91841	0.91841	0.91841
Space group	<i>C2</i>	<i>C2</i>	<i>C2</i>	<i>C2</i>
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	91.0, 64.8, 70.5	91.2, 65.1, 70.6	90.9, 65.0, 70.6	90.8, 64.7, 70.6
$\beta$ (°)	96.1	96.1	96.3	95.9
Matthews coefficient (Å <sup>3</sup> /Da)	2.4	2.4	2.4	2.4
Solvent content (%)	48.7	48.7	48.7	48.7
<b>B Diffraction Data</b>				
Resolution range <sup>a</sup> (Å)	30–1.42 (1.44–1.42)	50–1.42 (1.44–1.42)	50–1.66 (1.69–1.66)	50–1.22(1.24–1.22)
No. of unique reflections	76,896 (3,342)	77,486 (3,750)	48,267 (2,279)	117,888 (4,937)
Completeness <sup>a</sup> (%)	96.7 (87.2)	99 (96.2)	97.3 (95.5)	97.3 (81.7)
Redundancy	2.8 (2.1)	3.1 (2.6)	3.0 (2.9)	4.0 (3.3)
$R(I)_{\text{sym}}^{a,b}$ (%)	4.3 (15.5)	6.7 (41.6)	9.7 (47.3)	4.6 (41.7)
$I/\sigma(I)^a$	22.9 (4.6)	16.5 (2.2)	10.7 (2.5)	2.6 (26.1)
<b>C. Refinement</b>				



Programm	Phenix	Phenix	Phenix	Phenix
$R_{\text{work}}^c / R_{\text{free}}^d$ (%)	14.8 / 17.4	13.1 / 16.1	17.5 / 20.7	13.6 / 15.7
Protein residues	272	369	273	371
Water molecules	421	397	397	334
Ligand atoms	---	13	13	---
Ramachandran plot				
Residues in most favored regions (%)	95.5	94.9	94.7	95.9
Residues in additionally allowed regions (%)	4.7	4.8	4.7	3.8
Residues in generously allowed regions (%)	0.3	0.3	0.6	0.3
Mean $B$ -factors ( $\text{\AA}^2$ )				
Protein	8.3	14.2	17.7	16.4
Water	22.8	32.5	29.7	30.0
Ligand	---	15.7	30.0	---
RMSD from ideality				
rmsd angle ( $^\circ$ )	1.4	1.1	1.1	1.6
rmsd bond ( $\text{\AA}$ )	00.10	0.006	0.007	0.014

**Table 3C.** Crystallographic data collection and refinement statistics.

## 2.5.13 Acknowledgements

We gratefully acknowledge the staff of the PSF (Proteinstrukturfabrik) beamline BL-2 at BESSY II (Helmholz-Zentrum Berlin) in Berlin, Germany, for providing beamtime and outstanding support. We thank Christian Sohn for his support during "in house" X-ray data collection, François Diederich and Emmanuel Meyer for providing the uncompetitive Tgt inhibitor 2,6-diamino-3*H*-quinazolin-4-one, Steffi Dörr for expert technical assistance and Andreas Blum as well as Bernhard Stengl for helpful discussions.

## 2.5.14 Funding

This work was supported by the Philipps-Universität Marburg and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Graduiertenkolleg "Protein Function at the Atomic Level") (to NT, KR and GK). The travel costs to the BESSY II synchrotron in Berlin were covered by the

Helmholtz-Zentrum Berlin. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## 2.6 References

- **Adams PD, Afonine PV, Bunkóczi G, Chen VB, Davis IW *et al.* (2010)** PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr Sect D* 66: 213-221.
- **Boeckmann B, Bairoch A, Apweiler R, Blatter MC, Estreicher A, Gasteiger E, Martin MJ, Michoud K, O'Donovan C, Phan I, Pilbout S, Schneider M (2003)** The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Res* 31: 365-370.
- **Boland C, Hayes P, Santa-Maria I, Nishimura S, Kelly VP (2009)** Queuosine formation in eucaryotic tRNA occurs *via* a mitochondria-localized heteromeric transglycosylase. *J Biol Chem* 284: 18218-18227.
- **Brenk R, Stubbs MT, Heine A, Reuter K, Klebe G (2003)** Flexible adaptations in the structure of the tRNA-modifying enzyme tRNA-guanine transglycosylase and their implications for substrate selectivity, reaction mechanism and structure-based drug design. *ChemBioChem* 4: 1066-1077.
- **Brunger AT, Adams PD, Clore GM, DeLano WL, Gros P, Grosse-Kunstleve RW, Jiang JS, Kuszewski J, Nilges M, Pannu NS, Read RJ, Rice LM, Simonson T, Warren GL (1998)** Crystallography and NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr Sect D* 54: 905-921.
- **Chen V-C, Kelly VP, Stachura SV, Garcia GA (2010)** Characterization of the human tRNA-guanine transglycosylase: confirmation of the heterodimeric subunit structure. *RNA* 16: 958-968.
- **Chen V-C, Brooks AF, Goodenough-Lashua DM, Kittendorf JD, Showalter HD, Garcia GA (2011)** Evolution of eucaryal tRNA-guanine transglycosylase: insight gained from the heterocyclic substrate recognition by the wild-type and mutant human and *Escherichia coli* tRNA-guanine transglycosylases. *Nucleic Acids Res* 39: 2834-2844.
- **Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD (2003)** Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 31: 3497-3500.

- **Curnow AW, Kung FL, Koch KA, Garcia GA** (1993) tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli*: gross tRNA structural requirements for recognition. *Biochemistry* 32: 5239-5246.
- **Curnow AW, Garcia GA** (1995) tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli*. Minimal tRNA structure and sequence requirements for recognition. *J Biol Chem* 270: 17264-17267.
- **Deshpande KL, Katze JR** (2001) Characterization of cDNA encoding the human tRNA-guanine transglycosylase (TGT) catalytic subunit. *Gene* 265: 205-212.
- **Durand JM, Dagberg B, Uhlin BE, Björk GR** (2000) Transfer RNA modification, temperature and DNA superhelicity have a common target in the regulatory network of the virulence of *Shigella flexneri*: the expression of the *virF* gene. *Mol Microbiol* 35: 924-935.
- **Emsley P, Cowtan K** (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr Sect D* 60: 2126-2132.
- **Eswar N, Marti-Renom MA, Webb B, Madhusudhan MS, Eranian D, Shen M, Pieper U, Sali A** (2000) Comparative protein structure modelling with MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics*: Supplement 15:5.6.1-5.6.30.
- **Frey B, McCloskey J, Kersten W, Kersten H** (1988) New function of vitamin B12: cobamide-dependent reduction of epoxyqueuosine to queuosine in tRNAs of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 170: 2078-2082.
- **Garcia GA, Chervin SM, Kittendorf JD** (2009) Identification of the rate-limiting step of tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 48: 11243-11251.
- **Gerber H-D, Klebe G** (2012) Concise and efficient syntheses of preQ<sub>1</sub>, queuine and ent-queuine. (*in preparation*).
- **Goodenough-Lashua DM, Garcia GA** (2003) tRNA-guanine transglycosylase from *E. coli*: a ping-pong kinetic mechanism is consistent with nucleophilic catalysis. *Bioorg Chem* 31: 331-344.
- **Grädler U, Ficner R, Garcia GA, Stubbs MT, Klebe G, Reuter K** (1999) Mutagenesis and crystallographic studies of *Zymomonas mobilis* tRNA-guanine transglycosylase to elucidate the role of serine 103 for enzymatic activity. *FEBS Lett* 454: 142-146.
- **Grädler U, Gerber H-D, Goodenough-Lashua DAM, Garcia GA, Ficner R, Reuter K, Stubbs MT, Klebe G** (2001) A new target for Shigellosis: rational design and

crystallographic studies of inhibitors of tRNA-guanine transglycosylase. *J Mol Biol* 306: 455-467.

- **Grimm, C, Ficner R, Sgraja T, Haebel P, Klebe G, Reuter K** (2006) Crystal structure of *Bacillus subtilis* S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase. *Biochem Biophys Res Comm* 351: 695-701.
- **Hurt JK, Olgen S, Garcia GA** (2007) Site-specific modification of *Shigella flexneri* virF mRNA by tRNA-guanine transglycosylase *in vitro*. *Nucleic Acids Res* 35: 4905-4913.
- **Jerabek-Willemsen M, Wienken CJ, Braun D, Baaske, P, Duhr S** (2011) Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. *ASSAY and Drug Development Technologies* 9: 342-353.
- **Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR, Taylor R** (1997) Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol* 267: 727–748.
- **Kim Y, Zhou M, Moy S, Morales J, Cunningham MA, Joachimiak A** (2011) High-resolution structure of the nitrile reductase QueF combined with molecular simulations provide insight into enzyme mechanism. *J Mol Biol* 404: 127-137.
- **Kleywegt GJ, Zou JY, Kjeldgaard M, Jones TA**, Around O. In International Tables for Crystallography; **Rossmann MG, Arnold E**, (2001) *Eds, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht*, Vol F, pp 353-356
- **Kohler PC, Ritschel T, Schweizer WB, Klebe G, Diederich F** (2009) High-affinity inhibitors of tRNA-guanine transglycosylase replacing the function of a structural water cluster. *Chem Eur J* 15: 10809-10817.
- **Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM** (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr* 26: 283-291.
- **Lee BWK, Van Lanen SG, Iwata-Reuyl D** (2007) Mechanistic studies of *Bacillus subtilis* QueF, the nitrile oxidoreductase involved in queuosine biosynthesis. *Biochemistry* 46: 12844-12854.
- **Mathews I, Schwarzenbacher R, McMullan D, Abdubek P, Ambing E, Axelrod H et al.** (2005) Crystal structure of S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase (QueA) from *Thermotoga maritima* at 2.0 Å resolution reveals a new fold. *Proteins* 59: 869-874.
- **McCarthy RM, Somogyi A, Bandarian V** (2009a) *Escherichia coli* QueD is a 6-carboxy-5,6,7,8-tetrahydropterin synthase. *Biochemistry* 48: 2301-2303.

- **McCarthy RM, Somogyi A, Lin G, Jacobsen NE, Bandarian V** (2009b) The deazapurine biosynthetic pathway revealed: *in vitro* enzymatic synthesis of preQ<sub>0</sub> from guanosine 5'-triphosphate in four steps. *Biochemistry* 48: 3847-3852.
- **Meyer EA, Donati N, Guillot M, Schweizer WB, Diederich F, Stengl B, Brenk R, Reuter K, Klebe G** (2006) Synthesis, biological evaluation, and crystallographic studies of extended guanine-based (*lin*-benzoguanine) inhibitors for tRNA-guanine transglycosylase (TGT). *Helv Chim Acta* 89: 573-597.
- **Miles ZD, McCarthy RM, Molnar G, Bandarian V** (2011) Discovery of epoxyqueuosine (oQ) reductase reveals parallels between halorespiration and tRNA modification. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 7368-7372.
- **Molecular Operating Environment (MOE)** 2010.10; Chemical Computing Group Inc., 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2010.
- **Nakanishi S, Ueda T, Hori H, Yamazaki N, Okada N, Watanabe K** (1994) A UGU sequence in the anticodon loop is a minimum requirement for recognition by *Escherichia coli* tRNA-guanine transglycosylase. *J Biol Chem* 269: 32221-32227.
- **Neudert G, Klebe G** (2011) fconv: format conversion, manipulation and feature computation of molecular data. *Bioinformatics* 27: 1021-1022.
- **Okada N, Nishimura S** (1979) Isolation and characterization of a guanine insertion enzyme, a specific tRNA transglycosylase, from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 254: 3061-3066.
- **Oliva R, Tramontano A, Cavallo L** (2007) Mg<sup>2+</sup> binding and archaeosine modification stabilise the G15-C48 Levitt base pair in tRNAs. *RNA* 13: 1427-1436.
- **Otwinowski Z, Minor W.** (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol* 276: 307-326.
- **Painter J, Merritt EA** (2006) TLSMD web server for the generation of multi-group TLS models *J. Appl. Crystallogr.* 39: 109-111
- **Painter J, Merritt EA** (2006) Optimal description of a protein structure in terms of multiple groups undergoing TLS motion. *Acta Crystallogr Sect D: Biol. Crystallogr.* 62: 439-450.
- **Phillips G, Yacoubi BE, Lyons B, Alvarez S, Iwata-Reuyl D, de Crécy-Lagard V** (2008) Biosynthesis of 7-deazaguanosine-modified tRNA nucleosides: a new role for GTP cyclohydrolase I. *J Bacteriol* 190: 7876-7884.

- **Rakovich T, Boland C, Bernstein I, Chikwana VM, Iwata-Reuyl D, Kelly VP** (2011) Queuosine deficiency in eukaryotes compromises tyrosine production through increased tetrahydrobiopterin oxidation. *J Biol Chem* 286: 19354-19363.
- **Reuter K, Ficner R** (1995) Sequence analysis and overexpression of the *Z. mobilis tgt* gene encoding tRNA-guanine transglycosylase: purification and biochemical characterization of the enzyme. *J Bacteriol* 177: 5284-5288.
- **Ritschel T, Atmanene C, Reuter K, Van Dorsselaer A, Sanglier-Cianferani S, Klebe G** (2009a) An integrative approach combining noncovalent mass spectrometry, enzyme kinetics and X-ray crystallography to decipher Tgt protein-protein and protein-RNA interaction. *J Mol Biol* 393: 833-847.
- **Ritschel T, Hörtnner S, Heine A, Diederich F, Klebe G** (2009b) Crystal structure analysis and in silico pKa calculations suggest strong pKa shifts of ligands as driving force for high-affinity binding to TGT. *ChemBioChem* 10: 716-727.
- **Ritschel T, Kohler PC, Neudert G, Heine A, Diederich F, Klebe, G.** (2009c) How to replace the residual solvation shell of polar active site residues to achieve nanomolar inhibition of tRNA-guanine transglycosylase. *ChemMedChem* 4: 2012-2023.
- **Romier C, Ficner R, Reuter K, Suck D** (1996a) Purification, crystallization, and preliminary X-ray diffraction studies of tRNA-guanine transglycosylase from *Zymomonas mobilis*. *Proteins* 24: 516-519.
- **Romier C, Reuter K, Suck D, Ficner R** (1996b) Crystal structure of tRNA-guanine transglycosylase: RNA modification by base exchange. *EMBO J* 15: 2850-2857.
- **Romier C, Meyer JE, Suck D** (1997) Slight sequence variations of a common fold explain the substrate specificities of tRNA-guanine transglycosylases from the three kingdoms. *FEBS Lett* 416: 93-98.
- **Sheldrick GM, Schneider TR** (1997) SHELXL: high-resolution refinement. *Methods Enzymol* 277b: 319-343.
- **Stengl B, Reuter K, Klebe G** (2005) Mechanism and substrate specificity of tRNA-guanine transglycosylases (TGTs): tRNA-modifying enzymes from the three different kingdoms of life share a common catalytic mechanism. *ChemBioChem* 6: 1926-1939.
- **Tidten N, Stengl B, Heine A, Garcia GA, Klebe G, Reuter K** (2007) Glutamate versus glutamine exchange swaps substrate selectivity in tRNA-guanine transglycosylase: insight into the regulation of substrate selectivity by kinetic and crystallographic studies. *J Mol*

*Biol* 374: 764-776.

- **Van Lanen SG, Kinzie GS, Matthieu S, Link T, Culp J, Iwata-Reuyl D** (2003) tRNA modification by S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase. Assay development and characterisation of the recombinant enzyme. *J Biol Chem* 278: 10491-10499.
- **Van Lanen SG, Reader JS, Swairjo MA, de Crécy-Lagard V, Lee B, Iwata-Reuyl D** (2005) From cyclohydrolase to oxidoreductase: discovery of nitrile reductase activity in a common fold. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 4264-4269.
- **Wienken CJ, Baaske P, Rothbauer U, Braun D, Duhr S** (2010) Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nat Commun* 1: 100.
- **Xie W, Liu X, Huang RH** (2003) Chemical trapping and crystal structure analysis of a catalytic tRNA guanine transglycosylase covalent intermediate. *Nature Struct Biol* 10: 781-788.

### **3 Charakterisierung der katalytischen Untereinheit der eukaryotischen TGT (QTRT1), der nicht-katalytischen Untereinheit (QTRTD1) und des korrespondierenden Heterodimers**

#### **3.1 Ergebnisse und Diskussion**

##### **3.1.1 Konstruktion rekombinanter Expressionssysteme für die Gene der TGT-Untereinheiten aus Maus und Mensch**

Um die rekombinante Produktion der katalytischen sowie der nicht-katalytischen Untereinheiten der TGT aus Maus und Mensch in *Escherichia coli* in großen Mengen zu ermöglichen, wurden die entsprechenden Gene in den Expressionsvektor pASK-IBA13plus (IBA, Göttingen, Deutschland) eingebracht. Bei diesem Vektor steht das Zielgen unter der Kontrolle des *tetA*-Promoters aus dem Tetrazyklinresistenzoperon von *E. coli*. Vor Induktion der Expression wird die Transkription durch Binden des *tet*-Repressors an die Promoterregion effizient verhindert. Das Gen für den *tet*-Repressor befindet sich ebenfalls auf dem Vektor und wird konstitutiv exprimiert. Die Induktion der Zielgenexpression erfolgt dann durch das Tetrazyklinanalogon Anhydrotetrazyklin, welches den Repressor durch Binden inaktiviert. Die in den Vektor eingebrachten Gene für die TGT-Untereinheiten aus Maus und Mensch waren von der Firma GENEART (Regensburg, Deutschland) chemisch synthetisiert worden, wobei eine Kodon-Optimierung bezüglich des Expressionsorganismus *E. coli* vorgenommen worden war (DNA-Sequenzen s. Anhang). Die kodierten Aminosäuresequenzen entsprechen den UniProtKB/Swiss-Prot-Datenbank-Einträgen Q9BXR0 (menschliche QTRT1), Q9JMA2 (Maus-QTRT1), Q9H974 (menschliche QTRTD1) und B8ZXI1 (Maus-QTRTD1v1). Den chemisch synthetisierten Genen waren vorausgehend des Start-Kodons sowie nachfolgend des C-terminalen Kodons zusätzliche DNA-Abschnitte mit jeweils einer *BsaI*-Erkennungssequenz angefügt. Mit deren Hilfe erfolgte die Klonierung der Gene in die "Multiple Klonierungsstelle" des Expressionsvektors (s. Abb. 15). In den resultierenden Expressionsplasmiden ist das Zielgen am 5'-Ende jeweils an eine Sequenz fusioniert, die für ein N-terminales *Strep*-tag II® kodiert. Dieses aus acht Aminosäuren bestehende Tag mit einer molaren Masse von 1058 Da erlaubt die affinitätschromatographische Aufreinigung des Zielproteins mittels einer *Strep*-Tactin®-Matrix. Bei *Strep*-Tactin® handelt es sich um eine abgewandelte Form des äußerst stabilen



Proteins Streptavidin, welche das *Strep*-tag II® mit sehr hoher Affinität bindet. Die *Strep*-tag II®-Sequenz ist vom Startkodon des Zielgens durch eine "Spacersequenz" und eine für eine Thrombinschnittstelle kodierende Sequenz getrennt. Im Bedarfsfall ermöglicht diese Schnittstelle die proteolytische Abspaltung des *Strep*-tag II® nach der affinitätschromatographischen Aufreinigung des Zielproteins. Die erzeugten Expressionsplasmide erhielten folgende Bezeichnungen:

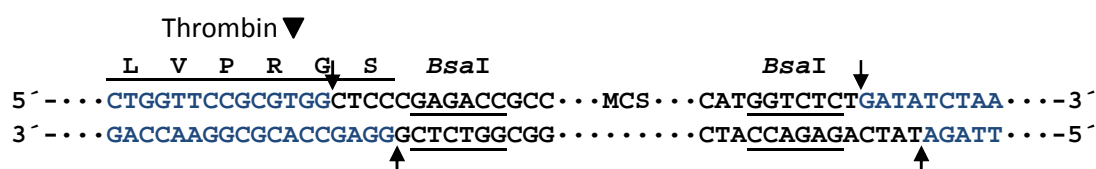
pASK-IBA13plus\_mTGT (für die Überexpression des mQTRT1-Gens),

pASK-IBA13plus\_mQv1 (für die Überexpression des mQTRTD1v1-Gens),

pASK-IBA13plus\_hTGT (für die Überexpression des hQTRT1-Gens),

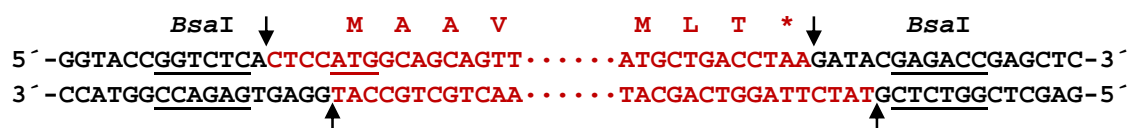
pASK-IBA13plus\_hQv1 (für die Überexpression des hQTRTD1-Gens).

pASK-IBA13plus:

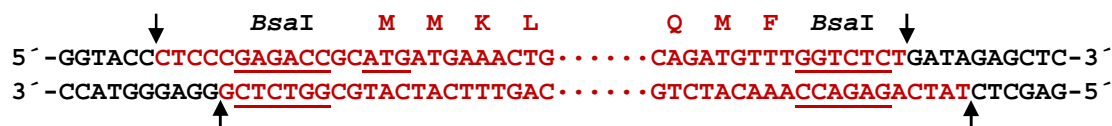


Synthetisierte und Kodon-optimierte Ziel-DNAs:

Maus-TGT (mQTRT1):



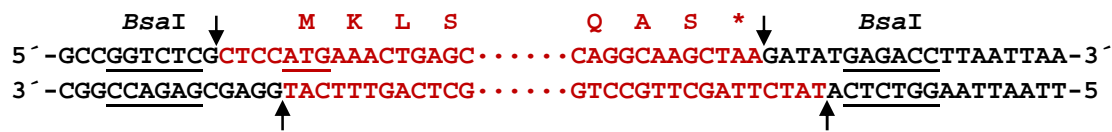
Maus-Qv1 (mQTRTD1):



Mensch-TGT (hQTRT1):

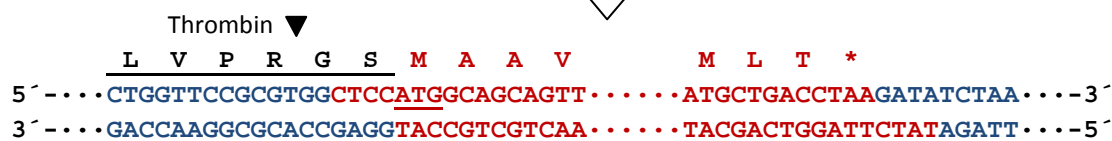


Mensch-Q (hQTRTD1):

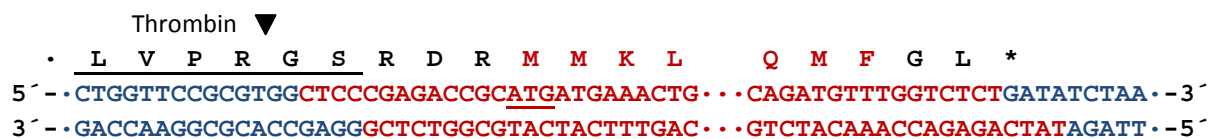


BsaI-Verdau und Ligation von Vektor- und Ziel-DNA

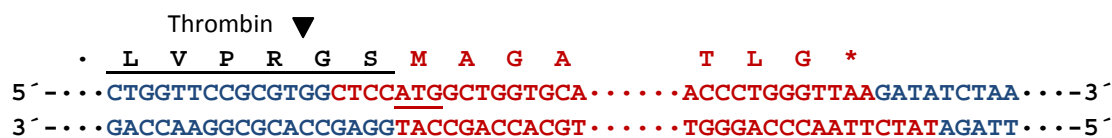
pASK-IBA13plus\_mTGT (mQTRT1)



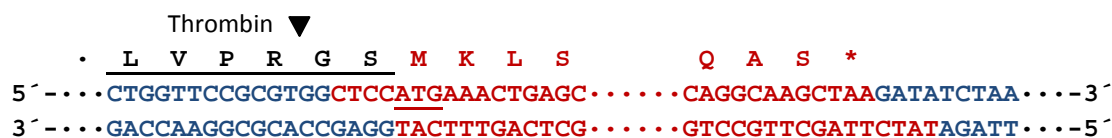
pASK-IBA13plus\_mQv1 (mQTRTD1)



pASK-IBA13plus\_hTGT (hQTRT1)



pASK-IBA13plus\_hQ (hQTRTD1)



**Abbildung 15:** Klonierung der Zielgene *mQTRT1*, *mQTRTD1*, *hQTRT1* und *hQTRTD1* in die "Multiple Klonierungsstelle" des Expressionsvektors pASK-IBA13plus

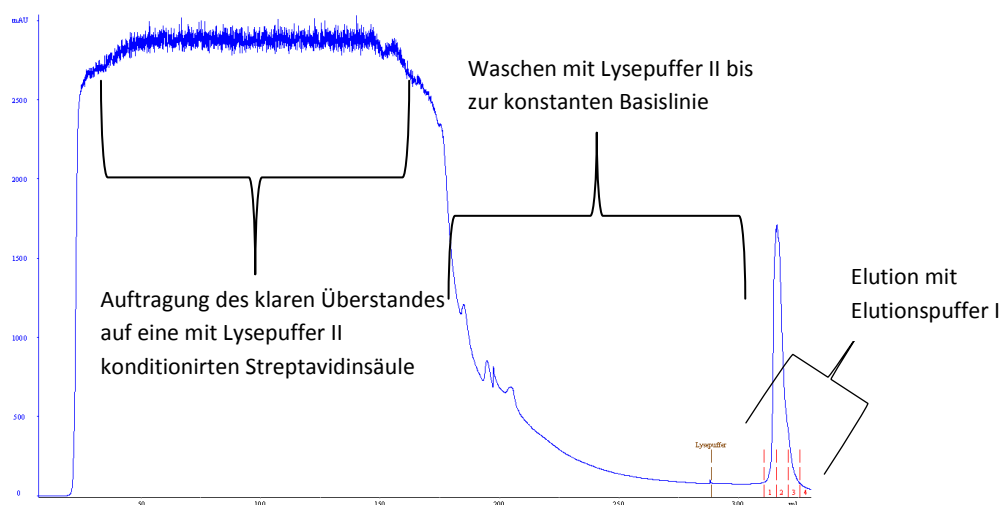
Sämtliche vier Zielgene (jeweils inclusive der für das *Strep*-tag II®- und die Thrombinschnittstelle kodierenden Sequenz) wurden darüber hinaus als *NheI*-*HindIII*-Fragment aus den pASK-IBA13plus-Expressionsplasmiden ausgeschnitten und in den Expressionsvektor pPR-IBA2 eingebracht. Die Transkription steht bei diesem Vektor unter

der Kontrolle eines T7-Promoters und ist durch IPTG induzierbar. Vorversuche zeigten jedoch, dass die Überproduktion der Zielproteine mit Hilfe dieses Vektors nur in geringem Umfang stattfand, weshalb die entsprechenden Plasmidkonstrukte in der vorliegenden Arbeit keine weitere Anwendung fanden.

### 3.1.2 Überproduktion, Aufreinigung und Charakterisierung der katalytischen Untereinheit der TGT aus der Maus (mQTRT1) und dem Menschen (hQTRT1)

#### 3.1.2.1 Überproduktion und Aufreinigung der QTRT1 aus Maus und Mensch

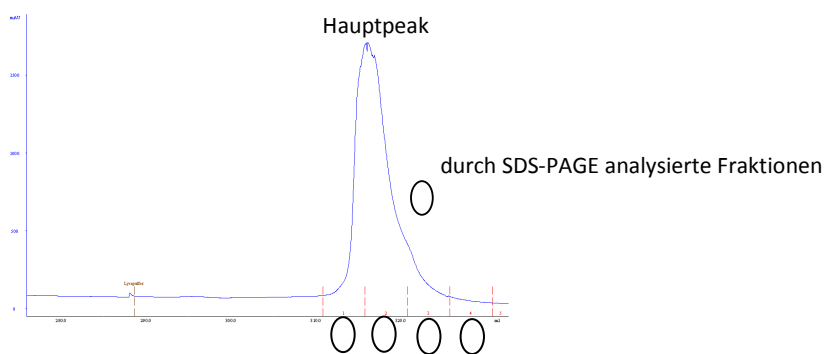
Die Überexpression des mQTRT1- und hQTRT1-Gens erfolgte in *E. coli* BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL-Zellen, welche mit dem Plasmid pASK-IBA13plus\_mTGT bzw. pASK-IBA13plus\_hTGT transformiert waren (zu Details s. Abschnitt 3.3.2). Nach der Zellernte und Resuspension des Zellpellets in Lysepuffer wurden die Bakterien mittels Ultraschall aufgeschlossen und die unlöslichen von den löslichen Zellbestandteilen durch Zentrifugation abgetrennt. Der klare Überstand, der das Zielprotein in gelöster Form enthielt, wurde dann auf eine mit Lysepuffer konditionierte *Strep-Tactin*®-Säule aufgetragen, sodass das Zielprotein über den *N*-terminalen *Strep*-tag II® an die Affinitätsmatrix binden konnte. Nach dem Waschen der Säule mit Lysepuffer erfolgte die Elution des Zielproteins mit Desthiobiotin-haltigem Elutionspuffer. Die Chromatogramme dieses Reinigungsschritts sind in Abb. 16 und 17 (mQTRT1) sowie in Abb. 19 (hQTRT1) gezeigt.



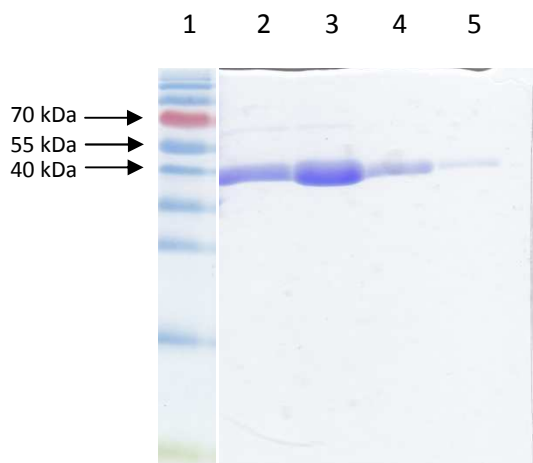
**Abbildung 16:** Chromatogramm der Affinitätschromatographie mittels *Strep-Tactin*®-Säule bei der

Reinigung der mQTRT1.

SDS-PAGE der proteinhaltigen Fraktionen des Eluats zeigte im Fall der mQTRT1 eine Bande, deren Laufhöhe einem Molekulargewicht von ca. 40 kDa entspricht. Obwohl dies von dem berechneten Molekulargewicht der mit einem *Strep*-tag® II versehenen mQTRT1 (46273 Da) etwas abweicht, sollte es sich hier um das Zielprotein handeln. Darüber hinaus sind auf dem Gel geringe Mengen einer offensichtlichen Verunreinigung mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa zu erkennen (Abb. 18). Im Fall der hQTRT1 zeigte das Gel, ebenfalls bei einem Molekulargewicht von ca. 40 kDa (berechnetes Molekulargewicht der mit einem *Strep*-tag® II versehenen hQTRT1: 46228 Da), nahezu reines Zielprotein (Abb. 20). Die proteinhaltigen Fraktionen der Affinitätschromatographie wurden schließlich jeweils vereinigt und auf ein Volumen von ca. 4 mL eingeeengt.



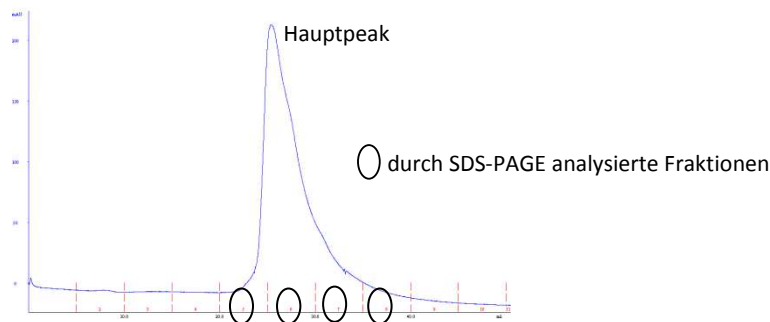
**Abbildung 17:** Elutionspeak aus dem Chromatogramm der Affinitätschromatographie mittels *Strep*-Tactin®-Säule bei der Reinigung der mQTRT1.



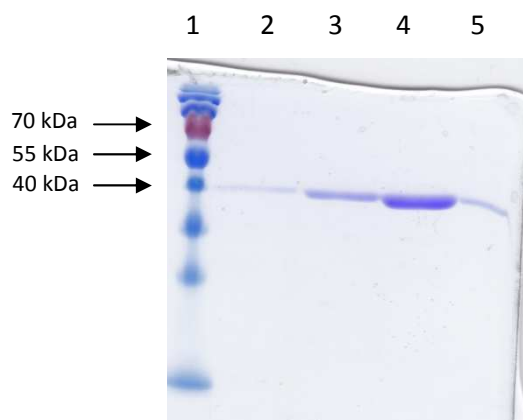
**Abbildung 18:** SDS-PAGE der proteinhaltigen Fraktionen des Eluats von der *Strep*-Tactin®-Säule bei

der Reinigung der mQTRT1.

Bande 1: Marker, Bande 2: Fraktion 1, Bande 3: Fraktion 2, Bande 4: Fraktion 3, Bande 5: Fraktion 4



**Abbildung 19:** Elutionspeak aus dem Chromatogramm der Affinitätschromatographie mittels *Strep-Tactin*® Säule bei der Reinigung der hQTRT1.

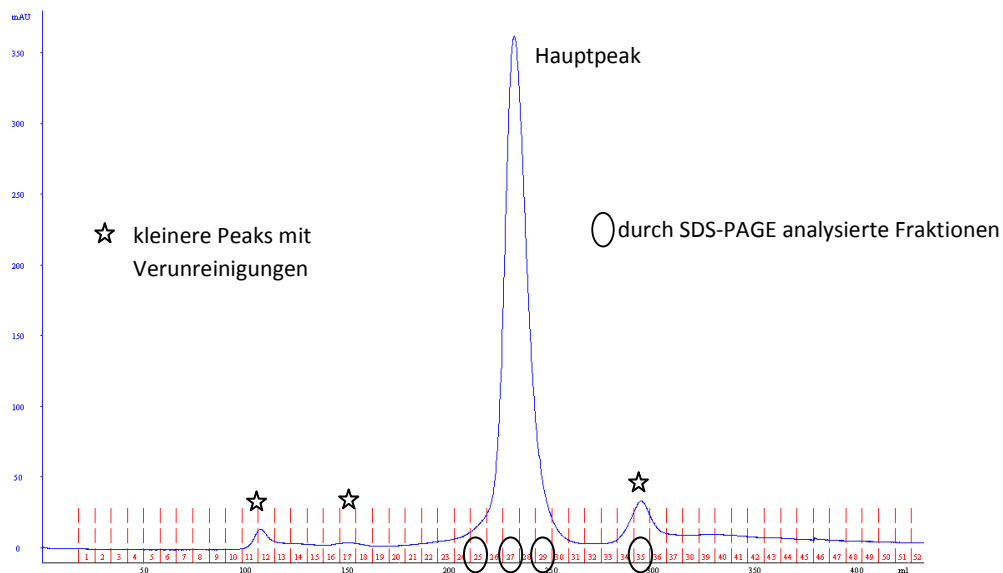


**Abbildung 20:** SDS-PAGE der proteinhaltigen Fraktionen des Eluats von der *Strep-Tactin*®-Säule bei der Reinigung der hQTRT1.

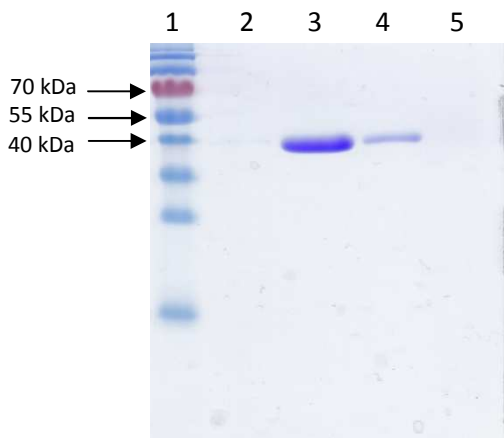
Bande 1: Marker, Bande 2: Fraktion 8, Bande 3: Fraktion 7, Bande 4: Fraktion 6, Bande 5: Fraktion 5

Die vereinigten und konzentrierten Zielprotein-haltigen Fraktionen wurden anschließend auf eine präparative Größenausschluss-Chromatographiesäule (HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 prep grade) aufgetragen und eluiert. Das Chromatogramm zeigt im Fall der mQTRT1 neben drei kleineren Peaks bei einem Elutionsvolumen von etwa 100 mL, 250 mL und 300 mL einen Hauptpeak bei einem Elutionsvolumen zwischen 200 mL und 260 mL (Fraktionen 24 bis 31) (Abb. 21). Im Fall der hQTRT1 ist auf dem Chromatogramm neben fünf kleineren Peaks bei einem Elutionsvolumen von 110 mL, 130 mL, 280 mL, 290 mL und 330 mL ein Hauptpeak bei einem Elutionsvolumen zwischen 210 mL und 260 mL zu erkennen (Fraktionen 26 bis 33) (Abb. 23). Mittels SDS-PAGE wurde gezeigt, dass der Hauptpeak in beiden Fällen das

Zielprotein in sehr reiner Form beinhaltete (mQTRT1: Abb. 22, hQTRT1: Abb. 24). Das niedrige Absorptionssignal, das der Hauptpeak im Fall der hQTRT1 lieferte (um nahezu eine Größenordnung niedriger als der Hauptpeak bei der Größenausschlusschromatographie der mQTRT1; s. Abb.n 21 und 23) ließ jedoch für die Präparation des menschlichen Orthologen eine wenig zufriedenstellende Gesamtausbeute erwarten. Nach Ankonzentrieren der vereinigten Zielprotein-haltigen Fraktionen betrug die Ausbeute der mQTRT1 4 mg gereinigtes Protein pro L Bakterienkultur, während von der hQTRT1 lediglich 0,3 mg gereinigtes Protein pro L Bakterienkultur gewonnen werden konnten. Ein  $A_{260}/A_{280}$  Absorptionsverhältnis von jeweils etwa 0,7 ließ darauf schließen, dass beide Präparationen weder DNA- noch RNA-Verunreinigungen enthielten. Die Präparationen wurden im Verlauf der vorliegenden Arbeit mit ähnlichen Ergebnissen zweimal reproduziert.

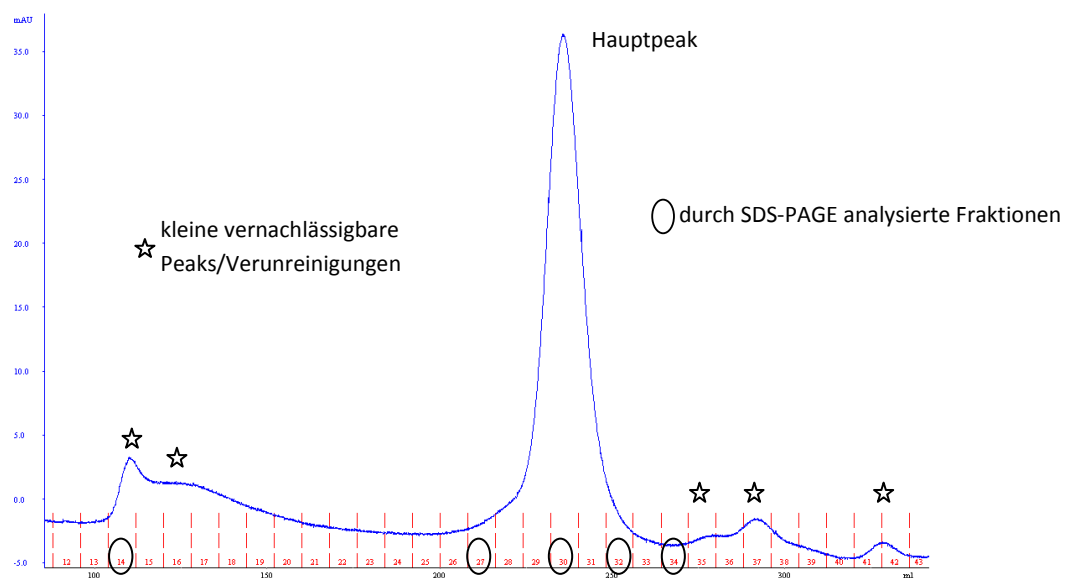


**Abbildung 21:** Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie mittels HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 prep grade-Säule bei der Reinigung der mQTRT1.

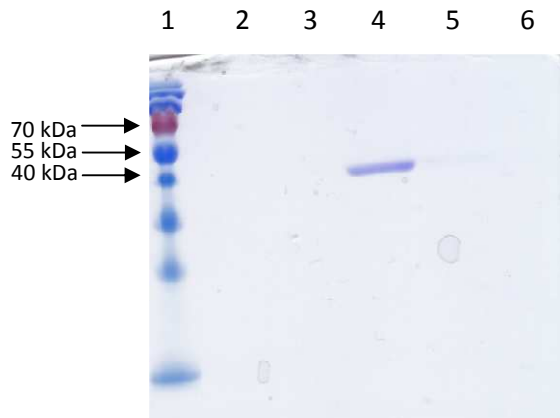


**Abbildung 22:** SDS-PAGE einzelner Fraktionen der Größenausschlusschromatographie bei der Reinigung der mQTRT1.

Bande 1: Marker, Bande 2: Fraktion 25, Bande 3: Fraktion 27, Bande 4: Fraktion 29, Bande 5: Fraktion 35



**Abbildung 23:** Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie mittels HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 prep grade-Säule bei der Reinigung der hQTRT1.



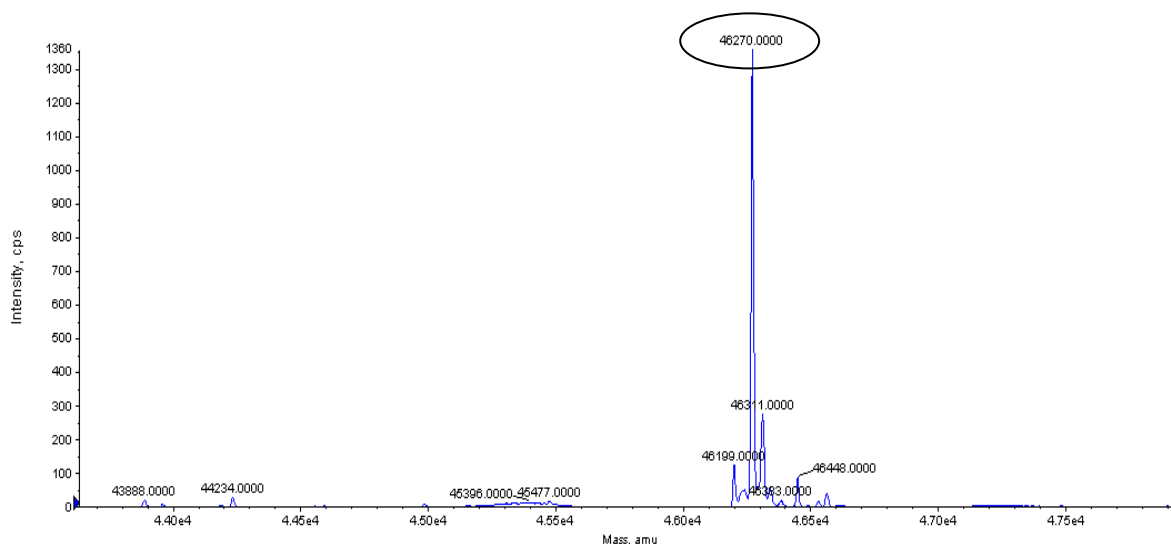
**Abbildung 24:** SDS-PAGE einzelner Fraktionen der Größenausschlusschromatographie bei der Reinigung der hQTRT1.

Bande 1: Marker, Bande 2: Fraktion 14, Bande 3: Fraktion 27, Bande 4: Fraktion 30, Bande 5: Fraktion 32, Bande 6: Fraktion 34

### 3.1.2.2 ESI-MS zur Untersuchung der Reinheit und Identität der mQTRT1 und hQTRT1

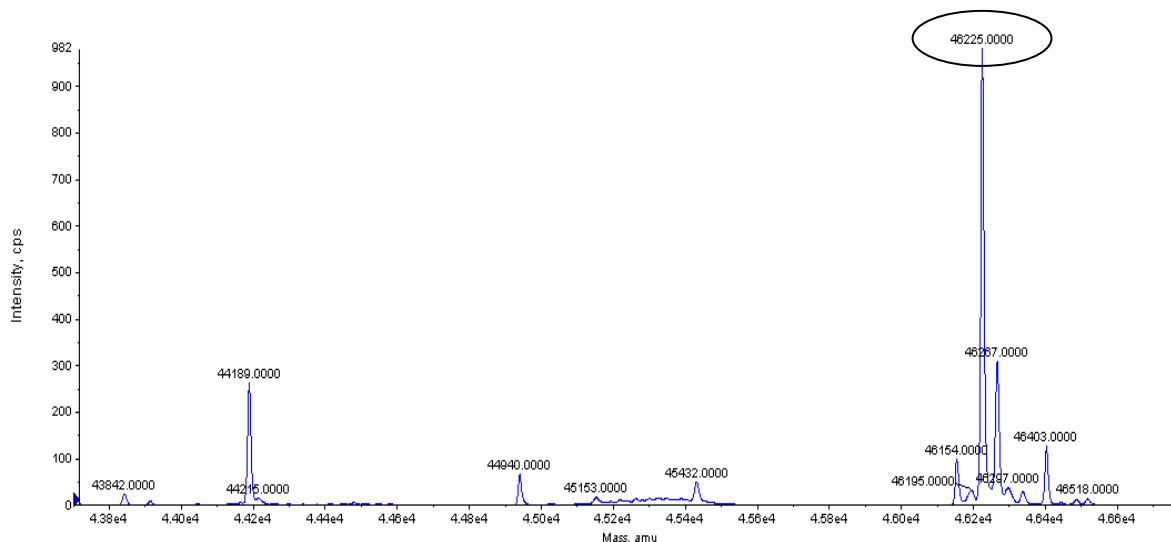
Vor der proteolytischen Abspaltung des *Strep*-tags® II wurden die Reinheit und das genaue Molekulargewicht der gereinigten Proteine mittels ESI-MS (Elektrospray-Ionisation gekoppelt mit Massenspektrometrie) überprüft. Dabei wurde für die mQTRT1 mit noch vorhandenem *Strep*-tag® II ein Molekulargewicht von 46270 Da ermittelt (Abb. 25), was hervorragend mit dem theoretischen Molekulargewicht dieses Proteins von 46273 Da übereinstimmt (Unterschiede von wenigen Da sind wohl auf den genauen Protonierungszustand des untersuchten Proteins zurückzuführen). Die Identität des gereinigten Zielproteins war damit zweifelsfrei nachgewiesen. Abb. 25 macht die starke Intensität des Messsignals deutlich und zeigt, dass das Protein nahezu rein vorlag.





**Abbildung 25:** HPLC-Massenspektrum der mit einem *Strep-tag*® II versehenen mQTRT1.

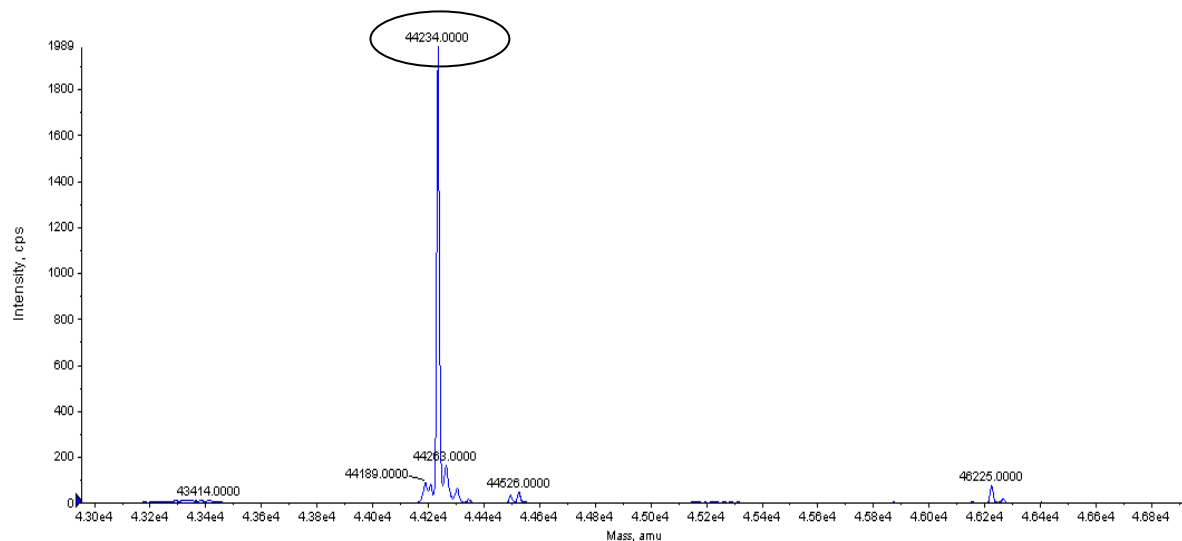
Im Fall der hQTRT1 betrug das experimentell ermittelte Molekulargewicht mit noch vorhandenen *Strep-tag*® II 46225 Da (Abb. 26). Auch dies stimmt mit dem theoretischen Molekulargewicht von 46228 Da sehr gut überein. Das HPLC-Massenspektrum zeigt neben dem Zielprotein noch geringe Verunreinigungen, die beim Abschneiden und Abtrennen des *Strep-tag*® II jedoch im Nachhinein entfernt werden konnten (siehe unten).



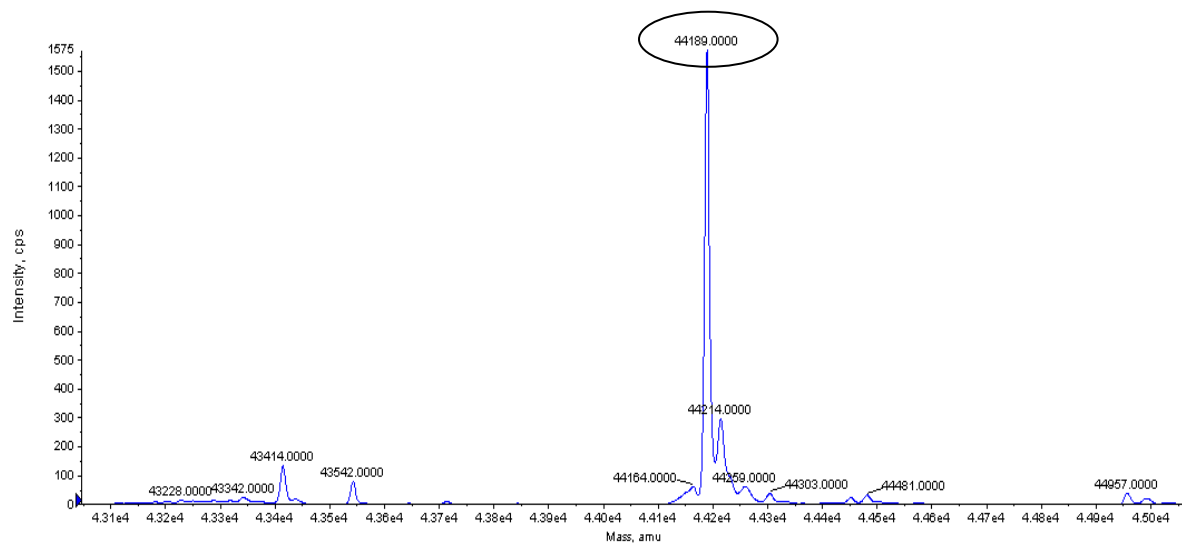
**Abbildung 26:** HPLC Massenspektrum der mit einem *Strep-tag*® II versehenen hQTRT1.

Die Abspaltung des *Strep-tag*® II erfolgte durch Verdau der gereinigten Proteine mit einer biotinylierten Version der Serinprotease Thrombin, was die affinitätschromatographische Entfernung der Protease zusammen mit dem abgespaltenen Tag ermöglichte (zu Einzelheiten s. Abschnitt 3.3.2.4). Um die Effizienz der Abspaltung, das exakte Molekulargewicht der Proteine nach der *Strep-tag*® II-Entfernung sowie die Reinheit der

Präparationen zu überprüfen, wurden nochmals HPLC-MS Experimente durchgeführt. Im Fall der mQTRT1 stimmte das experimentell ermittelte Molekulargewicht von 44234 Da (Abb. 27) mit dem theoretischen Molekulargewicht des vom *Strep*-tag® II befreiten Proteins (44237 Da) sehr gut überein. Auch das experimentell ermittelte Molekulargewicht der vom *Strep*-tag® II befreiten hQTRT1 (44189 Da) (Abb. 28) war mit dem theoretischen Molekulargewicht des Proteins (44192 Da) nahezu identisch. Die HPLC-Massenspektren zeigten darüber hinaus, dass beide Proteinpräparationen nach dem Entfernen des *Strep*-tag® II fast vollständig rein vorlagen.



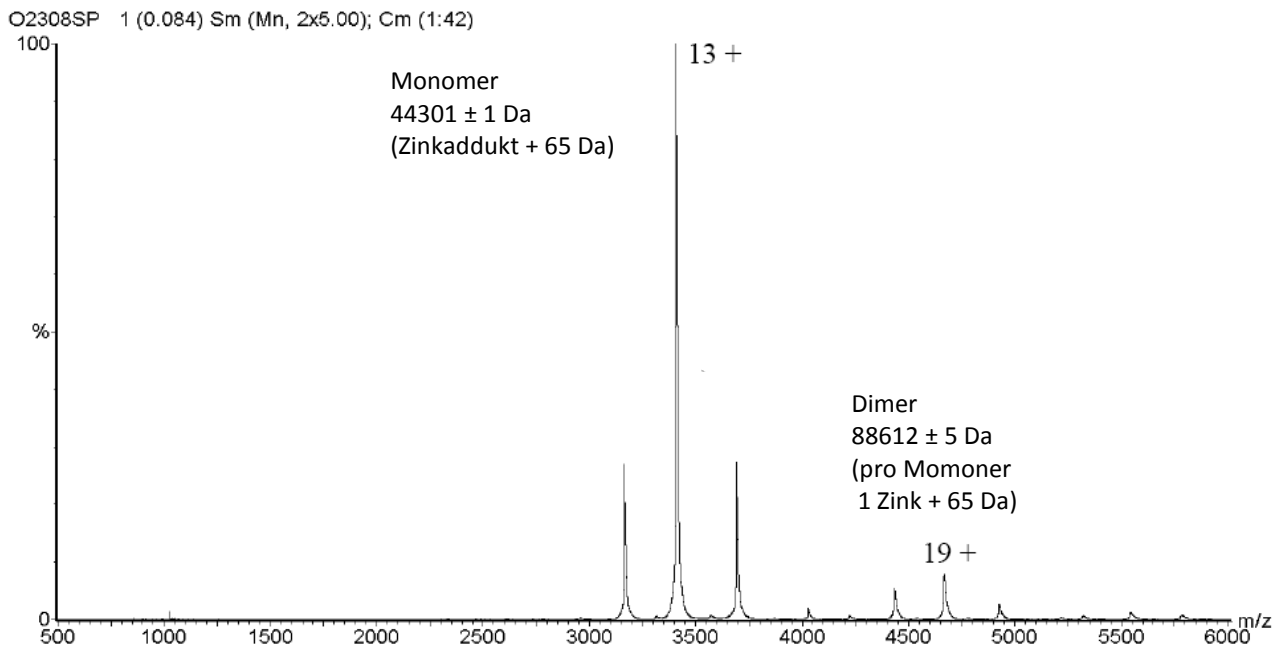
**Abbildung 27:** HPLC-Massenspektrum der vom *Strep*-tag® II befreiten mQTRT1.



**Abbildung 28:** HPLC-Massenspektrum der vom *Strep*-tag® II befreiten hQTRT1.

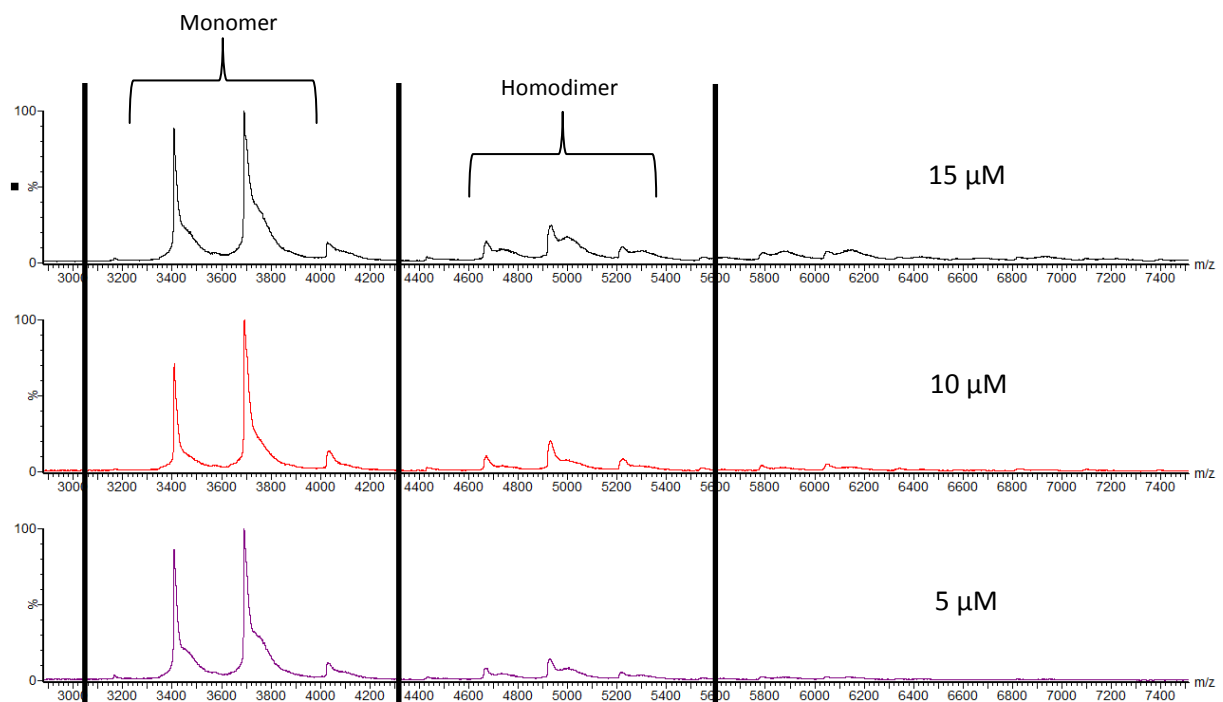
### **3.1.2.3 Untersuchung der Quartärstruktur der isolierten mQTRT1 bzw. hQTRT1 mittels NanoESI-MS unter nativen Bedingungen**

Um zu untersuchen, in welcher Quartärstruktur die QTRT1 aus der Maus bzw. aus dem Menschen in Abwesenheit des natürlichen Interaktionspartners QTRTD1 vorliegt, wurden nicht-fragmentierende NanoESI-MS-Experimente unter degradierenden Bedingungen durchgeführt. Diese Technik erlaubt die genaue Bestimmung des Molekulargewichts nicht-kovalenter Aggregate in der Gas-Phase und liefert folglich verlässliche Information über die Quartärstruktur von Proteinen bis hin zur Stöchiometrie von Protein-Nukleinsäure-Komplexen. Vorbereitend für die Messungen wurde die jeweilige Proteinlösung zunächst mittels Gelfiltration in einen 150 mM Ammoniumacetatpuffer pH 7,0 umgepuffert. Nach dem Pufferaustausch wurde die Proteinkonzentration (Abschnitt 3.3.5.3) erneut photometrisch bestimmt und durch Verdünnen auf 5  $\mu\text{M}$  eingestellt. Tatsächlich zeigte die mit der mQTRT1 durchgeführte NanoESI-MS, dass dieses Protein in der eingesetzten Konzentration zu etwa 20 % als Homodimer und zu 80 % als Monomer vorliegt (wobei in jedem Fall pro Polypeptidkette ein  $\text{Zn}^{2+}$  gebunden ist; Massendifferenz: 65 Da) (Abb. 29). Die in Abb. 30 gezeigten ESI-Massenspektren machen deutlich, dass sich in einem Konzentrationsbereich zwischen 5  $\mu\text{M}$  und 15  $\mu\text{M}$  mQTRT1 das Monomer:Homodimer-Verhältnis bei abnehmender Proteinkonzentration nur geringfügig zu Gunsten des Monomers verschiebt. Ein ähnliches Ergebnis wurde für die hQTRT1 erhalten. Bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  liegt das Protein zu etwa 10 % als Homodimer und zu 90 % als Monomer vor (auch hier ist pro Polypeptidkette ein  $\text{Zn}^{2+}$  gebunden; Massendifferenz: 65 Da) (Abb. 31).



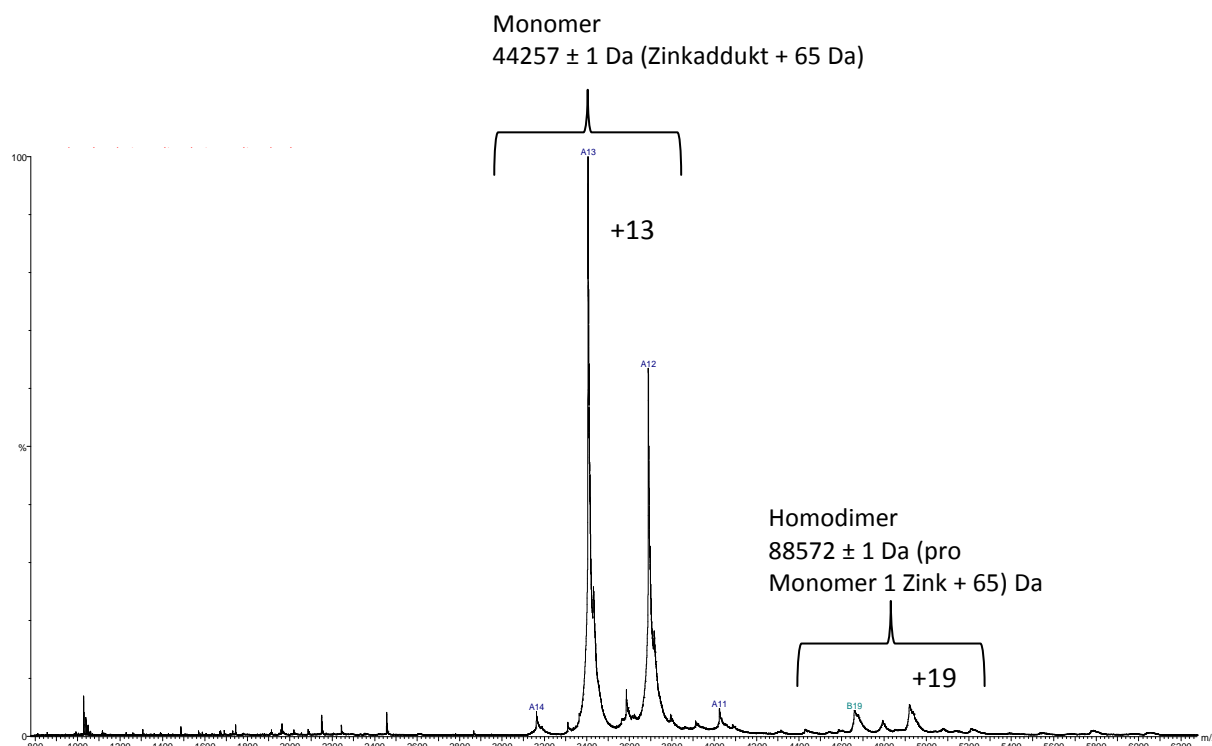
**Abbildung 29:** ESI-Massenspektrum:

NanoESI-MS-Analyse der mQTRT1 unter nativen Bedingungen ( $V_{\text{ESI}} = 1,8$  kV, bP = 0,8 psi, Vc = 150, Pi = 5 mbar)



**Abbildung 30:** ESI-Massenspektren

Monomer : Homodimer Verhältnis der mQTRT1 in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration ( $V_{\text{ESI}} = 1,8$  kV, bP = 0,8 psi, Vc = 150, Pi = 5 mbar)



**Abbildung 31:** ESI-Massenspektrum.

NanoESI-MS-Analyse der hQTRT1 unter nativen Bedingungen ( $V_{\text{ESI}} = 1,8 \text{ kV}$ ,  $bP = 0,8 \text{ psi}$ ,  $V_c = 120$ ,  $P_i = 6 \text{ mbar}$ ).

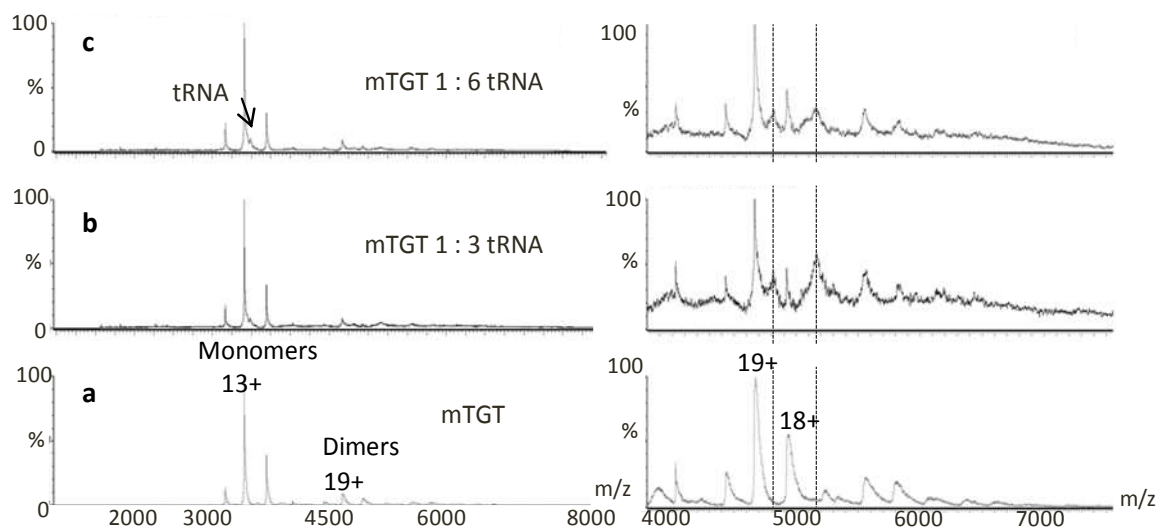
### 3.1.2 4 Ermittlung der Enzymaktivität der mQTRT1 und hQTRT1

Die Untersuchung der QTRT1 aus der Maus bzw. dem Menschen auf etwaige Enzymaktivität erfolgte mittels eines Assays, bei dem der Einbau von  $[8\text{-}^3\text{H}]$ -Guanin in das TGT-Substrat  $\text{tRNA}^{\text{Tyr}}$  verfolgt wird (s. Abschnitt 3.3.8). Tatsächlich konnte bei keinem der beiden Orthologen eine radioaktive Markierung der tRNA beobachtet werden. Dies bestätigte die Ergebnisse von Boland et al. [2009] sowie Chen et al. [2010], welche ebenfalls beobachtet hatten, dass die katalytische Untereinheit der eukaryotischen TGT (QTRT1) in Abwesenheit des Heterodimerpartners (QTRTD1) inaktiv ist.

### 3.1.2.5 Untersuchung der Substratbindung durch die mQTRT1

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die QTRT1 aus der Maus, welche keinerlei TGT-Aktivität aufweist, dennoch in der Lage ist, auch in Abwesenheit des Heterodimerpartners QTRTD1 eines der TGT-Substrate zu binden. Dazu wurden zunächst Thermophoresemessungen des Proteins mit  $\text{tRNA}^{\text{Tyr}}$ , Guanin,  $\text{preQ}_1$  bzw. Queuin

durchgeführt (s. Abschnitt 3.3.10). Mit dieser Methode konnte jedoch bei keinem der genannten Substrate eine Bindung qualitativ oder quantitativ beobachtet werden. Hier muss jedoch angemerkt werden, dass ein negatives Ergebnis eines Thermophorese-Experiments eine Wechselwirkung des untersuchten Proteins mit dem Liganden nicht ausschließt, da nicht jeder Ligand bei jedem Protein eine signifikante Veränderung bewirkt, die sich thermophoretisch nachweisen lässt. Daher wurden, um ein eventuelles Binden des tRNA<sup>Tyr</sup>-Substrats an die mQTRT1 zu überprüfen, weitere NanoESI-MS Experimente unter nativen Bedingungen durchgeführt. Auch hier wurde das Protein und die tRNA<sup>Tyr</sup> zunächst in einen 150 mM Ammoniumacetatpuffer pH 7,0 umgepuffert. Bei den Messungen lag die mQTRT1 in einer vorgegebenen Konzentration von 5  $\mu$ M vor, während die tRNA<sup>Tyr</sup> in variierenden Konzentrationen von 0  $\mu$ M, 15  $\mu$ M und 30  $\mu$ M eingesetzt wurde. Die resultierenden ESI-Massenspektren sind in Abb. 32 gezeigt. Bei einer tRNA<sup>Tyr</sup>-Konzentration von 15  $\mu$ M und 30  $\mu$ M konnte zwischen 3000 und 3500 m/z ein Signal für die ungebundene tRNA<sup>Tyr</sup> detektiert werden. Darüber hinaus tauchte bei diesen tRNA<sup>Tyr</sup>-Konzentrationen im Bereich zwischen 4000 und 7000 m/z überraschenderweise aber auch ein Signal für einen Komplex aus QTRT1 und tRNA<sup>Tyr</sup> im Verhältnis 1:1 ( $72197 \pm 2$  Da) auf. Der Protein-tRNA<sup>Tyr</sup>-Komplex liegt nur zu einem sehr kleinen Anteil vor, ist jedoch im Rahmen der Messgenauigkeit der verwendeten Methode noch detektierbar.



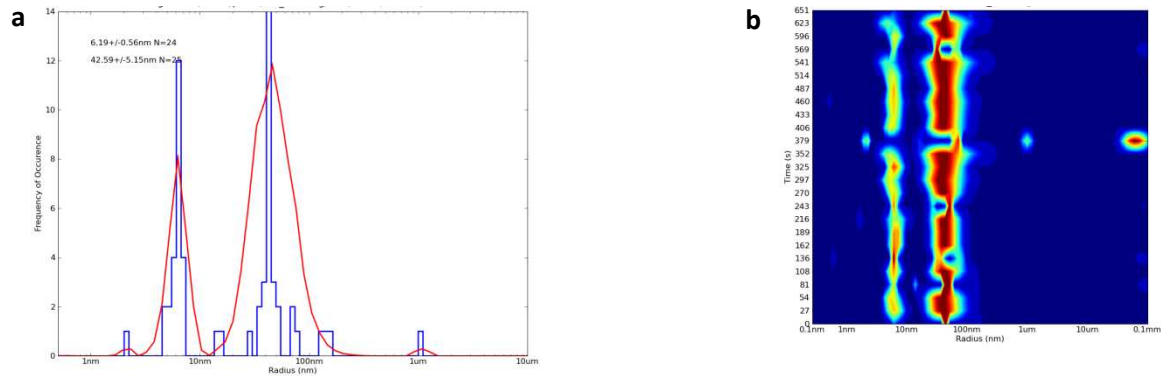
**Abbildung 32:** ESI-Massenspektren:

- a: mTGT (5 $\mu$ M)
- b: mTGT (5 $\mu$ M) + tRNA (15  $\mu$ M)
- c: mTGT (5 $\mu$ M) + tRNA (30  $\mu$ M)

rechts: Zoom des Bereichs zwischen 4000 bis 7000 m/z. Die gestrichelten Linien zeigen Peaks an, die einem Komplex aus QTRT1 und tRNA<sup>Tyr</sup> im Verhältnis 1:1 entsprechen. ( $V_{\text{ESI}} = 1,8 \text{ kV}$ ,  $bP = 0,8 \text{ psi}$ ,  $V_c = 150$ ,  $P_i = 5,5 \text{ mbar}$ )

### 3.1.2.6 Untersuchung der Dispersität von mQTRT1-Lösungen mittels DLS (Dynamische Lichtstreuung)

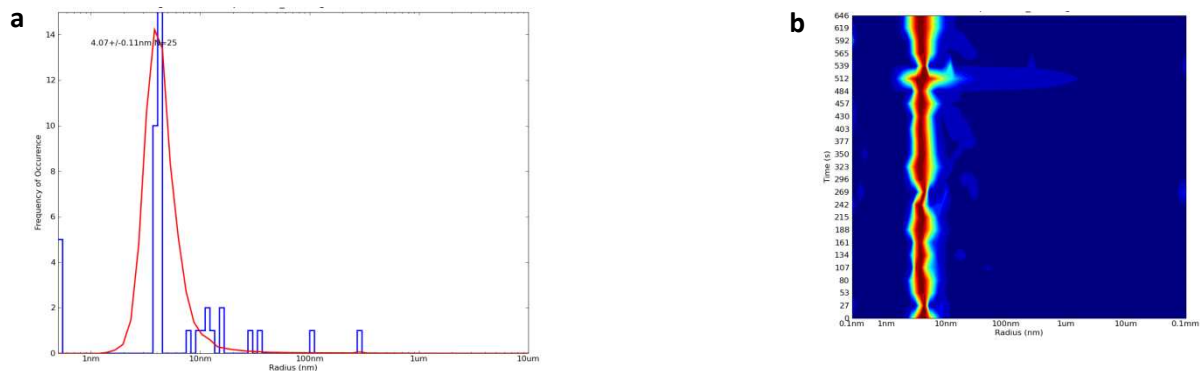
Vorbereitend für Kristallisationsversuche wurde im Anschluss mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) (Abschnitt 3.3.11) eine mQTRT1-Lösung mit einer Konzentration von 5 mg/mL auf ihre Dispersität hin untersucht. Anzustreben ist eine homogene und monodisperse Proteinlösung, welche die Ausbildung von Kristallkeimen begünstigt [Proteau et al., 2010]. Um höhermolekulare unspezifische Aggregate in der Proteinlösung zu entfernen, wurde sie zunächst für 5 min bzw. für 60 min mit  $16000 \times g$  bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Mit dem Überstand wurden dann jeweils DLS-Messungen durchgeführt. Deren Ergebnisse sind in Abbildung 33 und 34 als Histogramm (jeweils a) und in der *carpet*-Darstellung (jeweils b) gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass nach einer Zentrifugationsdauer von nur 5 min eine polydisperse Proteinlösung vorliegt (Abb. 33). Neben dem freien ungebundenen Protein mit einem Radius von unter 10 nm (kleinerer Peak in der Histogrammdarstellung, dünner schwach ausgeprägter Streifen in der *carpet*-Darstellung) liegen größere Proteinaggregate mit einem Radius von etwa 100 nm vor (größerer Peak in der Histogrammdarstellung, dickerer Streifen in der *carpet*-Darstellung). Nach einer Zentrifugationsdauer von 60 min (Abb. 34) liegt hingegen eine komplett monodisperse Proteinlösung vor, die neben dem freien ungebundenen Protein mit einem Radius von unter 10 nm praktisch keine größeren Aggregate enthält (nur ein Peak in der Histogrammdarstellung und nur ein Streifen in der *carpet*-Darstellung). Dies zeigt die Notwendigkeit, die mQTRT1-Lösung vor jedem Kristallisationsansatz für wenigstens 60 min bei  $16000 \times g$  zu zentrifugieren.



**Abbildung 33:** Dynamische Lichtstreuung der mQTRT1-Lösung nach 5 min Zentrifugation bei  $16000 \times g$

a: Histogrammdarstellung der Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung.

b: *carpet* - Darstellung der Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung.



**Abbildung 34:** Dynamische Lichtstreuung der mQTRT1-Lösung nach 60 min Zentrifugation bei  $16000 \times g$

a: Histogramm der Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung

b: *carpet* - Darstellung der Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung

### 3.1.2.7 Untersuchung der Stabilität der mQTRT1 mit Hilfe des Thermal Shift Assays

Mit Hilfe von *Thermal Shift* Messungen (Abschnitt 3.3.13) ist es möglich, verschiedene Puffersystem und Additive hinsichtlich ihres Einfluss auf die Stabilität eines gelösten Proteins hin zu testen. Je besser ein Protein durch ein Puffersystem oder ein Additiv in Lösung stabilisiert wird, desto erfolgreicher lässt es sich über längere Zeit lagern. Darüber hinaus sind die Chancen einer erfolgreichen Kristallisation bei einer Proteinlösung, in der das Protein möglichst stabil vorliegt, deutlich erhöht. Die stabilisierende Wirkung eines Puffersystems oder Additivs auf ein Protein wird im Thermal Shift Assay als Erhöhung der



Schmelztemperatur ( $T_m$ ) des Proteins wahrgenommen, wogegen ein destabilisierender Einfluss zu einer Erniedrigung der  $T_m$  führt. Am EMBL in Hamburg wurden von Dr. Stephane Boivin zahlreiche Additive (Tabelle 5) und Puffer (Tabelle 6) auf ihren Einfluss auf die  $T_m$ (mQTRT1) getestet. Die für die Messungen eingesetzte Ausgangslösung enthielt das Protein in einer Konzentration von 40  $\mu$ M in 10 mM TrisHCl pH 8,5 und 100 mM NaCl. Die Ausgangs- $T_m$ (mQTRT1) in dieser Lösung betrug zunächst etwa 48°C.

	Additive	Konzentration	$T_m$ -Shift
<b>Chaotrope Denaturierungsmittel:</b>	Harnstoff	0,1 – 6 M	Protein stabil bis 0,5 M Urea
<b>Salze:</b>	Guanidiniumchlorid	150 und 500 mM	k.E.
	Na(HCO <sub>2</sub> )	100 mM	k.E.
	K(HCO <sub>2</sub> )	100 mM	k.E.
	NH <sub>4</sub> (HCO <sub>2</sub> )	100 mM	k.E.
	Na(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> )	100 mM	+2°C
	Ca(C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	100 mM	-2°C
	K(CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> )	100 mM	k.E.
	NH <sub>4</sub> (CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> )	100 mM	k.E.
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100 mM	+2°C
	Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100 mM	k.E.
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100 mM	k.E.
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100 mM	k.E.
	Na <sub>2</sub> (HPO <sub>4</sub> )	100 mM	k.E.
	Na(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	100 mM	-3°C
	K <sub>2</sub> (HPO <sub>4</sub> )	100 mM	k.E.
	K(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	100 mM	-3°C
	Na <sub>2</sub> (C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> )	100 mM	k.E.
	Na <sub>3</sub> (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> )	100 mM	+3°C
	Na <sub>2</sub> (C <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O <sub>4</sub> )	100 mM	k.E.
	NaNO <sub>3</sub>	100 mM	+2°C
<b>Monovalente Ionen:</b>	NaF	100 mM	k.E.
	KF	100 mM	k.E.
	NH <sub>4</sub> F	100 mM	-4°C
	LiCl	100 mM	k.E.
	NaCl	100 mM	k.E.
	KCl	100 mM	k.E.
	NH <sub>4</sub> Cl	100 mM	k.E.
	NaI	100 mM	-2°C
	KI	100 mM	-4°C
	NaBr	100 mM	k.E.
<b>Multivalente Ionen :</b>	MgCl <sub>2</sub>	10 mM	k.E.
	CaCl <sub>2</sub>	10 mM	k.E.
	MnCl <sub>2</sub>	1 mM	k.E.
	NiCl <sub>2</sub>	1 mM	k.E.
	ZnCl <sub>2</sub>	1 mM	k.E.
	CoCl <sub>2</sub>	1 mM	k.E.
	FeCl <sub>3</sub>	1 mM	k.E.

	DTT	10 mM	k.E.
	TCEP	1-20 mM	Stark negativer Einfluss auf Proteinfaltung
<b>Polyamine:</b>	Trimethylamin	100 mM	k.E.
	Spermidin	1 mM	k.E.
	Spermin-HCL	1mM	k.E.
<b>Imidazol:</b>	Imidazol	50 – 500 mM	<b>-12°C</b>
<b>Detergentien:</b>	CHAPS	2 mM	k.E.
	Octyl-β-D-Glucosid	1 mM	k.E.
<b>Alkohole:</b>	Ethylenglycol	3 %	k.E.
	Glycerin	1 – 20 %	<b>+5°C</b>
	PEG 400	5 %	k.E.
	PEG 1000	5 %	k.E.
	PEG 4000	5 %	k.E.
<b>Aminosäuren:</b>	L-Prolin	10 mM	k.E.
	Taurin	50 mM	k.E.
	L-Glycin	50 mM	k.E.
	L-Histidin	50 mM	k.E.
	L-Arginin	50 mM	k.E.
	L-Arginin + L-Glycin	50 mM und 500 mM	<b>+6°C</b>
	L-Glutamat	50 mM	k.E.
	L-Glutamin	25 mM	k.E.
	L-Lysin	50 mM	k.E.
<b>Zucker:</b>	D-Glucose	100 mM	k.E.
	Sucrose	100 mM	k.E.
	Maltose	100 mM	k.E.
	D-Sorbitol	100 mM	k.E.
<b>Cofaktoren:</b>	NADH/MgCl <sub>2</sub>		k.E.
	ATP/MgCl <sub>2</sub>		k.E.
	ADP/MgCl <sub>2</sub>		k.E.
	cAMP/MgCl <sub>2</sub>		k.E.
	GTP/MgCl <sub>2</sub>		k.E.
	GDP/MgCl <sub>2</sub>		k.E.
	cGMP/MgCl <sub>2</sub>		k.E.

**Tabelle 5:** Thermal Shift Assay: *Additivscreen* mit der katalytischen Untereinheit mQTRT1.

Getestete Additive mit Konzentrationsangabe und Effekt auf die Proteinfaltung und Schmelztemperatur  $T_m$  der katalytischen Untereinheit mQTRT1 (**grün:** Erhöhung der  $T_m$ , **rot:** Erniedrigung der  $T_m$ , k.E. : kein Effekt zu beobachten).

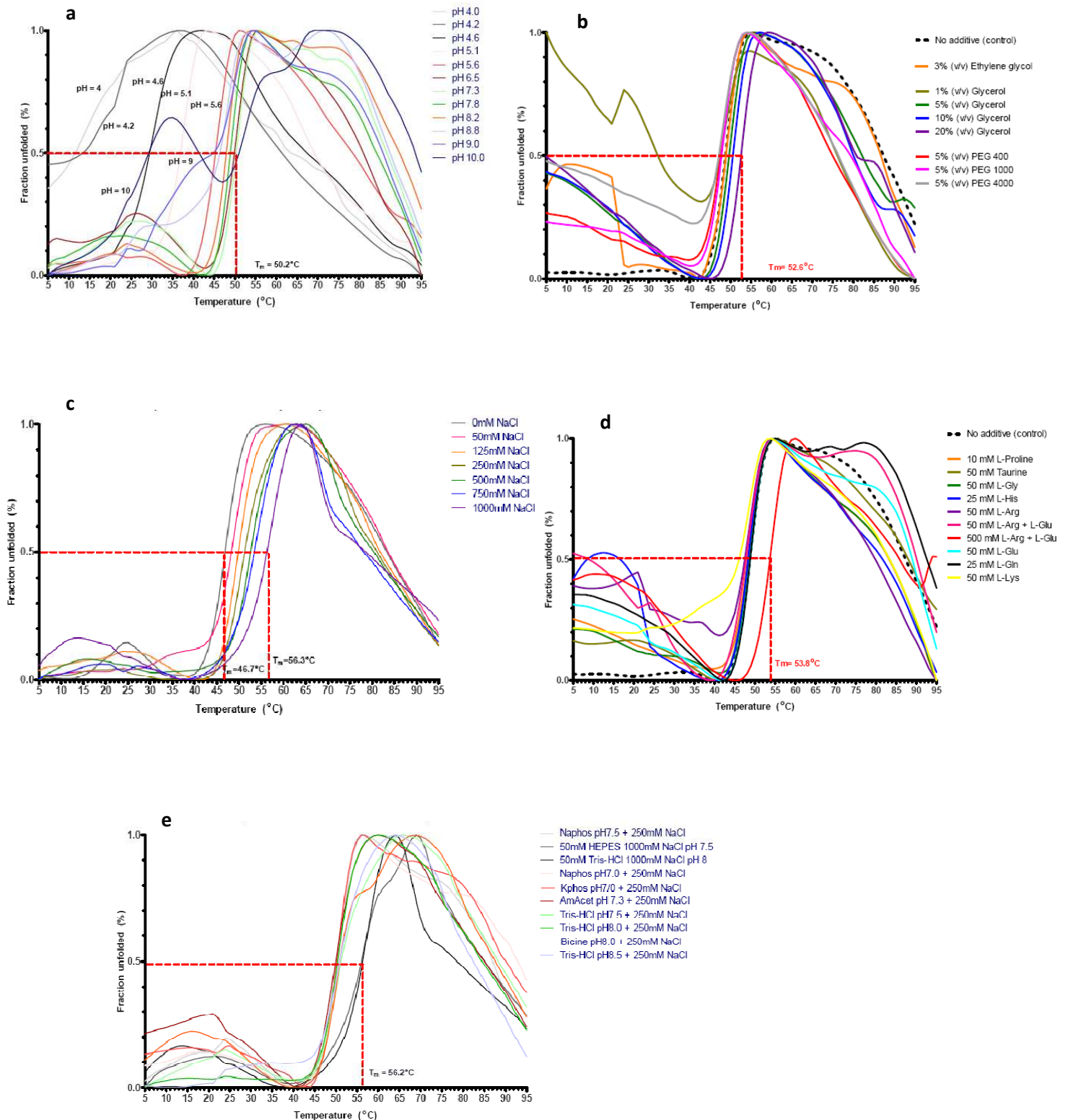
	Puffer	Konzentration	
<b>pH Bereich 4 – 10 :</b>	Zitronensäure, Ches, HEPES, Succinylsäure, Glycin, Orthophosphorsäure)		pH 6,6 - 7,8 Protein zeigt beste Stabilität <b>+3°C</b>
<b>NaCl:</b>	50 mM HEPES pH 7,5	1 M NaCl	<b>+10°C</b>
	50 mM Tris pH 8,0	1 M NaCl	<b>+10°C</b>
<b>Puffer:</b>	HEPES pH 7,5	10 – 250 mM	100 - 250 mM

			<b>+2°C</b>
	Na <sub>2</sub> (HPO <sub>4</sub> ) pH 7,5	10 – 200 mM	100 - 200 mM <b>+4°C</b>
	Tris-HCl pH 8,0	10 – 250 mM	k.E.
<b>10 beste Pufferbedingungen:</b>	Natriumphosphat pH 7,5 und 250 mM NaCl		k.E.
	50 mM HEPES pH 7,5 und 1M NaCl		<b>+9°C</b>
	50 mM Tris pH 8,0 und 1 M NaCl		<b>+9°C</b>
	Natriumphosphat pH 7,0 und 250 mM NaCl		k.E.
	Kaliumphosphat pH 7,0 und 250 mM NaCl		k.E.
	Ammoniumacetat pH 7,3 und 250 mM NaCl		k.E.
	Tris-HCl pH 7,5 und 250 mM NaCl		k.E.
	Tris-HCl pH 8,0 und 250 mM NaCl		k.E.
	Bicine pH 8,0 und 250 mM NaCl		k.E.
	Tris-HCl pH 8,5 und 250 mM NaCl		k.E.

**Tabelle 6:** Thermal Shift Assay: *Pufferscreen* mit der katalytischen Untereinheit mQTRT1

Getestete Pufferbedingungen mit Konzentrationsangabe und Auswirkung auf die Schmelztemperatur  $T_m$  (**grün**: Erhöhung der  $T_m$ , **rot**: Erniedrigung der  $T_m$ , k.E.: kein Effekt zu beobachten).

Die Ergebnisse zeigten, dass die beste Stabilisierung der mQTRT1 in einem pH-Bereich von 6,5 bis 7,8 zu beobachten ist (Abb. 35a,  $T_m$ -shift von etwa +3°C). Weiterhin wurde der Effekt von Alkoholen (Abb. 35b) und Aminosäuren (Abb. 35d) auf das Protein näher untersucht. Dabei scheint die Stabilität des gefalteten Proteins ab einem Glycerinvolumenanteil von 5 % deutlich begünstigt zu sein ( $T_m$ -shift von etwa +4°C). Auch die Zugabe von 50 mM L-Arg + L-Glu führt zur Verschiebung der Schmelztemperatur bis zu +5 °C. Eine Zugabe vom 1 M NaCl führt zu einer Erhöhung der Schmelztemperatur von bis zu +10°C, was auf eine deutliche Stabilisierung des Proteins verweist (Abb. 35c). Das Puffersystem (Abb. 35e), welches das Protein bei diesem *Thermal Shift* Assay bestmöglich stabilisiert, hat folgende Zusammensetzung: 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 M NaCl und 2 mM DTT ( $T_m$ -shift von etwa +8 °C).



**Abbildung 35:** Thermal Shift Assay mit der mQTRT1

**a:** Zitronensäure-, Ches-, HEPES-Puffer im einem Bereich von pH 4 – pH 10

**b:** Alkohole

von oben : Ethylenglycol 3 %, Glycerin 1 %, Glycerin 5 %, Glycerin 10 %, Glycerin 20 %, PEG 400 5 %, PEG 1000 5 %, PEG 4000 5%

**c: Aminosäuren:**

von oben: 10 mM L-Prolin, 50 mM Taurin, 50 mM L-Glycin, 25 mM L-Histidin, 50 mM L-Arginin, 50 mM L-Arginin und L-Glutamat, 500 mM L-Arginin und L-Glutamat, 50 mM L-Glutamat, 25 mM L-Glutamin, 50 mM L-Lysin

**d: Natriumchlorid:**

von oben: 0 mM, 50 mM, 125 mM, 250 mM, 500 mM, 750 mM, 1000 mM

**e: Verschiedene Puffersysteme:**

von oben: Natriumphosphat pH 7,5 und 250 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5 und 1M NaCl, 50 mM Tris pH 8,0 und 1 M NaCl, Natriumphosphat pH 7,0 und 250 mM NaCl, Kaliumphosphat pH 7,0 und 250 mM NaCl, Ammoniumacetat pH 7,3 und 250 mM NaCl, Tris-HCl pH 7,5 und 250 mM NaCl, Tris-HCl pH 8,0 und 250 mM NaCl, Bicin pH 8,0 und 250 mM NaCl, Tris-HCl pH 8,5 und 250 mM NaCl.

### 3.1.2.8 Kristallisationsversuche mit der mQTRT1

Um geeignete Kristallisationsbedingungen für die mQTRT1 zu finden, wurden *Inhouse*-Kristallisations-Screens (Tabelle 7) sowie *Screens* der Firma Qiagen (Tabelle 8) eingesetzt. Dabei wurden insgesamt etwa 4800 unterschiedliche Kristallisationsbedingungen mit der Methode der Dampfdiffusion (sitzender Topfen) getestet. Die für die Versuche eingesetzte Proteinlösung enthielt die mQTRT1 in unterschiedlicher Konzentration (s. Tabellen 7 und 8) in 50 mM TrisHCl pH 7,5, 1 M NaCl und 2 mM DTT. Die Pipettage erfolgte durch einen Kristallisationsroboter, wobei die anfängliche Tropfengröße 0,30 µL bei einem Reservoirvolumen von 80 µL betrug (s. Abschnitt 3.3.15). Neben der Zusammensetzung der Reservoirlösung wurden die Proteinkonzentration, die Temperatur und die Proteinlänge (mit bzw. ohne *Strep*-tag II®) variiert. Von den getesteten *Inhouse*-Kristallisations-Screens (Tabelle 8) führte keine Bedingung zur Bildung von Proteinkristallen. Die Bedingung JCSG Core II A1 (0,2 M Natriumchlorid, 0,1 M CAPS pH 10,5 und 20 % PEG 8000) aus den *Screens* der Firma Qiagen lieferte dagegen bei 18 °C und einer Proteinkonzentration von 9 mg/mL nach zwei Tagen kleine nadelförmige Kristalle (Abb. 36a), deren Größe innerhalb eines weiteren Tages deutlich zunahm (Abb. 36b), die sich aber am vierten Tag nahezu komplett wieder aufgelöst hatten (Abb. 36c). Offensichtlich hatte die hohe NaCl-Konzentration in der Proteinlösung und damit im Kristallisationstropfen innerhalb des genannten Zeitraums durch die Dampfdiffusion zu einer deutlichen Verdünnung der Proteinlösung im Tropfen geführt. Der Versuch, diese Kristalle im Labormaßstab ( $V_{\text{Reservoirlösung}} = 1 \text{ mL}$ ,  $V_{\text{Kristallisationstropfen}} = 2 \text{ µL}$ ) mit Originallösungen der Firma Qiagen zu reproduzieren, war leider nicht erfolgreich.

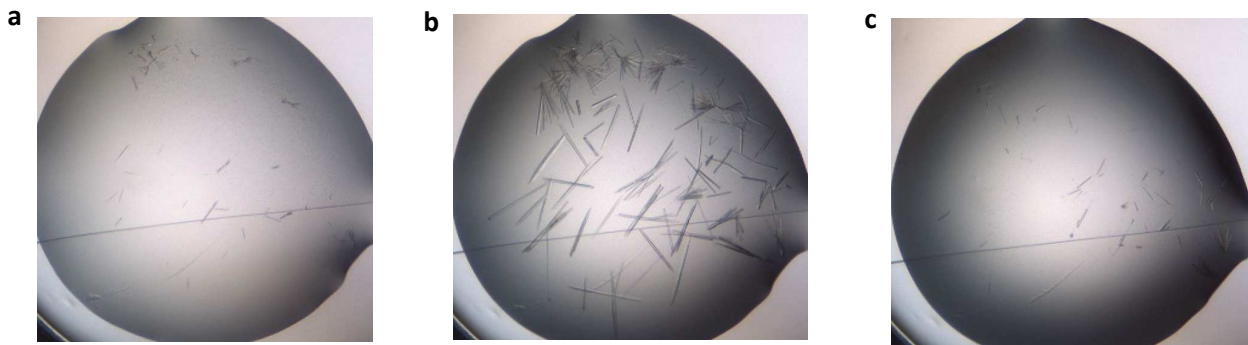
Inhouse-Screens	Proteinkonzentration [mg/mL]	Puffer	Temperatur [°C]	Bemerkung			
Wizard I 1-48	19	10 mM Tris, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, pH 7,9	18	+ <i>Strep</i> -tag Protein denaturiert			
Wizard II 1-48							
Wizard I 1-48	6						
Wizard II 1-48							
Cryo I 1-48							
PEG/Ionen 1-48	5				4	+ <i>Strep</i> -tag	
Cryo I 1-48							
Wizard I 1-48	3				18		
Wizard II 1-48							
Cryo II 1-48							
Crystal Screen 1-48	2,5						
PEG/Ionen 1-48				3	- <i>Strep</i> -tag		
Wizard I 1-48	9		50 mM Tris, pH 7,5, 1 M NaCl, 2 mM DTT	18	- <i>Strep</i> -tag		
Wizard II 1-48							
Crystal Screen 1-48							

**Tabelle 7:** Getestete *Inhouse* Kristallisations-Screens mit der katalytischen Untereinheit mQTRT1

Pipettierroboter-Screens Cartesian Microsys™ SQ 4000 / “honey bee”	Proteinkonzentration [mg/mL]	Puffer	Temperatur [° C]	Bemerkung
Cryos Suite*	2,5	10 mM Tris, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, pH 7,9	18	+ <i>Strep</i> -tag
Classics Suite*				
Classics lite Suite*				
Anions Suite*				
PACT Suite*				
JCSG+ Suite*				
MbClass Suite*				
MbClass II Suite*				
Cryos Suite*	3	10 mM Tris, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, pH 7,9	18	- <i>Strep</i> -tag
Classics Suite*				
Classics lite Suite*				
Anions Suite*				
PACT Suite*				

JCSG+ Suite*				
MbClass Suite*				
MbClass II Suite*				
Cryos Suite*	7	10 mM Tris, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, pH 7,9	18	-Strep-tag
Classics Suite*				
Classics lite Suite*				
PACT Suite*				
JCSG+ Suite*				
JCSG Core I Suite*				
JCSG Core II Suite*				
JCSG Core III Suite*				
JCSG Core IV Suite*				
MbClass Suite*				
MbClass II Suite*				
Cryos Suite*	14	10mM Tris, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, pH 7,9	18	-Strep-tag
Classics Suite*				
Classics lite Suite*				
PACT Suite*				
JCSG+ Suite*				
JCSG Core I Suite*				
JCSG Core II Suite*				
JCSG Core III Suite*				
JCSG Core IV Suite*				
MbClass Suite*				
MbClass II Suite*				
Cryos Suite*	9	50 mM Tris, pH 7,5, 1 M NaCl, 2 mM DTT	18	-Strep-tag
JCSG Core I Suite*				
JCSG Core II Suite*				
JCSG Core III Suite*				
JCSG Core IV Suite*				

**Tabelle 8:** Getestete Kristallisations-Screens (Qiagen) der katalytischen Untereinheit mTGT durchgeführt mit dem Pipetierroboter Cartesian Microsys™ SQ 4000 / "honey bee".



**Abbildung 36:** Proteinkristalle der katalytischen Untereinheit mQTRT1 bei der Bedingung JCSG Core II A1 (Qiagen), Puffer: 0,2 M Natriumchlorid, 0,1 M CAPS pH 10,5 und 20 % PEG 8000 bei 18 °C.

a: Tag 2, b: Tag 3, c: Tag 4.

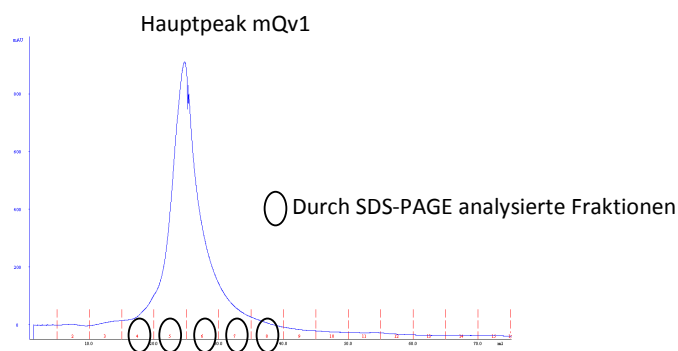
### 3.1.3 Überproduktion, Aufreinigung und Charakterisierung der Queuino-tRNA-Ribosyltransferase mit einer Protein-1 Domäne (Isoform 1) aus der Maus (mQTRTD1v1) (nicht-katalytische Untereinheit)

#### 3.1.3.1 Überproduktion und Aufreinigung der mQTRTD1v1

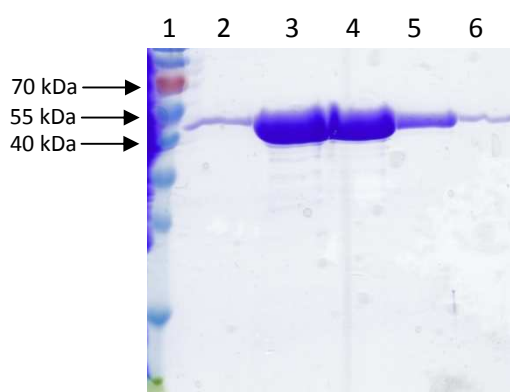
Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Überproduktion und Reinigung sowohl der menschlichen als auch der Maus-QTRTD1-Untereinheit durchgeführt. Da bei der Präparation des menschlichen Orthologs jedoch, wie im Fall der katalytischen Untereinheit, nur unzufriedenstellende Ausbeuten (< 0,4 mg Protein pro Liter Bakterienkultur) erzielt wurden, wird im Folgenden lediglich auf die Ergebnisse mit dem Maus-Ortholog eingegangen.

Die Überexpression des mQTRTD1v1-Gens erfolgte durch den *E. coli*-Stamm BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL, der mit dem Plasmid pASK-IBA13plus\_mQv1 transformiert worden war (zu experimentellen Details s. Abschnitt 3.3.3.1). Nach der Zellernte wurde das Zellpellet in Lysepuffer resuspendiert und die Bakterienzellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Die Trennung der löslichen von den unlöslichen Zellbestandteilen erfolgte anschließend durch Zentrifugation. Der klare Überstand, in dem das Zielprotein in gelöster Form vorlag, wurde schließlich auf eine mit Lysepuffer konditionierte *Strep-Tactin*® Säule aufgetragen. Nach Waschen der Säule mit Lysepuffer erfolgte die Elution der mQTRTD1v1 mit Desthiobiotinhaltigem Elutionspuffer. Der relevante Abschnitt des Chromatogramms dieses Reinigungsschritts ist in Abb. 37 gezeigt.





**Abbildung 37:** Elutionspeak aus dem Chromatogramm des Eluats von der *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Säule während der Reinigung der mQTRTD1v1.

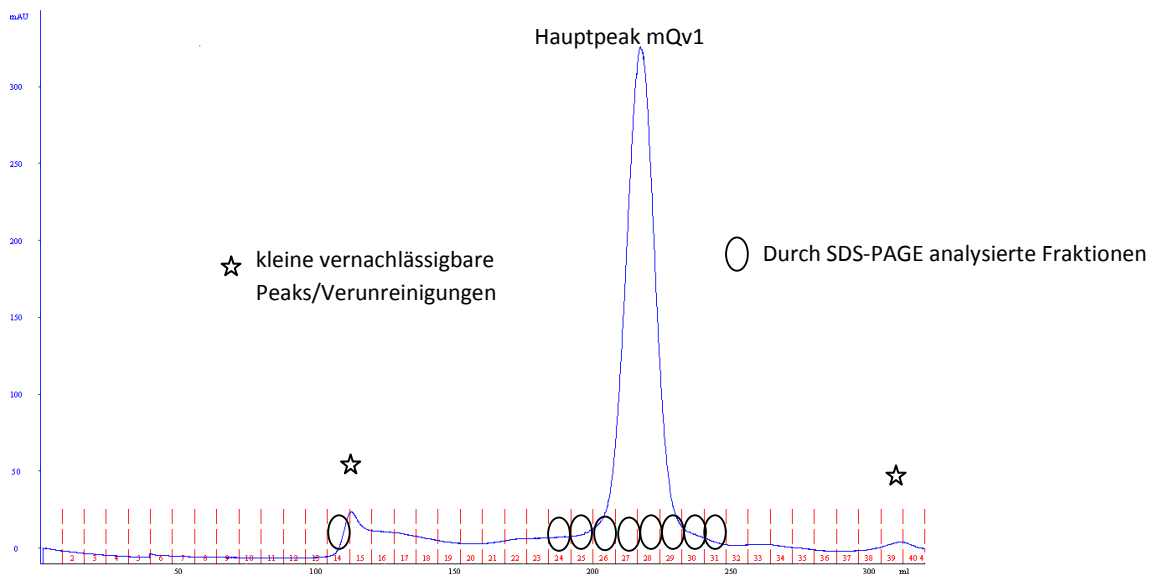


**Abbildung 38:** SDS-Gel der proteinhaltigen Fraktionen des Eluats von der *Strep-Tactin*<sup>®</sup>-Säule bei der Reinigung der mQTRTD1v1.

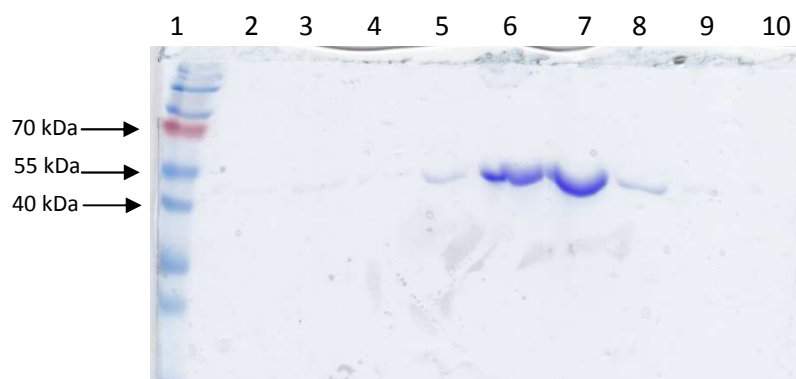
Bande 1: Marker, Bande 2: Fraktion 4, Bande 3: Fraktion 5, Bande 4: Fraktion 6, Bande 5: Fraktion 7, Bande 6: Fraktion 8

Die Analyse der proteinhaltigen Fraktionen mittels SDS-PAGE zeigt eine Bande, deren Laufhöhe einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa entspricht (Abb. 38; berechnetes Molekulargewicht: 49171,5 Da). Die proteinhaltigen Fraktionen wurden anschließend vereinigt und auf ein Volumen von etwa 4 mL eingengt. Die konzentrierte Proteinlösung wurde anschließend auf eine präparative Größenausschluss-Chromatographiesäule (HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 prep grade) aufgetragen und eluiert. Das Chromatogramm zeigt neben zwei kleineren Peaks bei ca. 110 und 310 mL Elutionsvolumen einen großen Hauptpeak bei einem Elutionsvolumen zwischen 200 mL und 250 mL (Abb. 39). Eine SDS-PAGE-Analyse der Fraktionen, welche den Hauptpeak umfassten, zeigte, dass das Protein nach diesem Chromatographieschritt in sehr reiner Form vorlag (Abb. 40). Nach Vereinen und Ankonzentrieren der mQTRTD1v1-haltigen Fraktionen betrug die Ausbeute etwa 4 mg gereinigtes Protein pro L Bakterienkultur. Das Verhältnis  $A_{260}/A_{280}$  der Präparation lag bei ca.

0,7, woraus ersichtlich ist, dass sie weder nennenswerte DNA- noch RNA-Verunreinigung aufwies.



**Abbildung 39:** Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie mittels einer HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 prep grade Chromatographiesäule-Säule während der Reinigung der mQTRTD1v1.



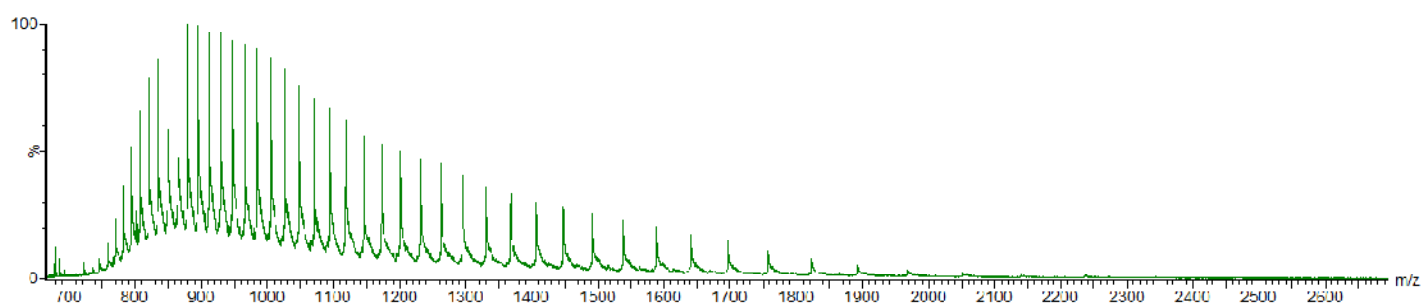
**Abbildung 40:** SDS-PAGE einzelner Fraktionen der Größenausschlusschromatographie bei der Reinigung der mQTRTD1v1.

Bande 1: Marker, Bande 2: Fraktion 14, Bande 3: Fraktion 24, Bande 4: Fraktion 25, Bande 5: Fraktion 26, Bande 6: Fraktion 27, Bande 7: Fraktion 28, Bande 8: Fraktion 29, Bande 9: Fraktion 30, Bande 10: Fraktion 31

### 3.1.3.2 ESI-MS und HPLC-MS zur Untersuchung der Reinheit und Identität der mQTRTD1v1

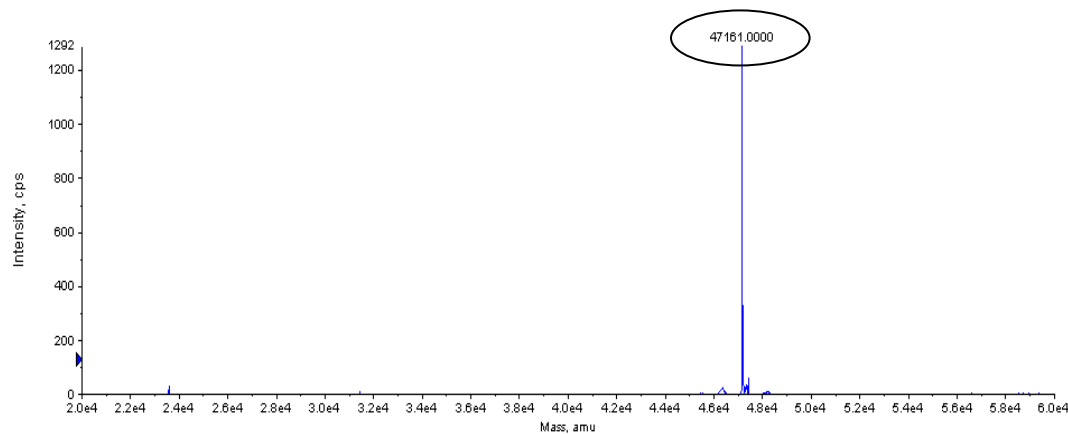
Bevor die proteolytische Entfernung des *Strep*-tag® II vorgenommen wurde (Abschnitt 3.3.2.4), wurden die Reinheit und das exakte Molekulargewicht des gereinigten Proteins

mittels ESI-MS bestimmt. Dazu wurde das Protein zunächst in einen 500 mM Ammoniumacetatpuffer pH 7,0 umgepuffert und mit einer 50/50/1 Wasser/Acetonitril/Essigsäure Mischung auf eine Konzentration von 2  $\mu$ M verdünnt. Das durch ESI-MS bestimmte Molekulargewicht von  $49197 \pm 1$  Da der mQTRTD1v1 mit noch vorhandenem *Strep*-tag® II stimmte mit dem theoretischen Molekulargewicht der mQTRTD1v1 von 49197,5 Da praktisch genau überein. Das in Abb. 41 gezeigte ESI-Massenspektrum zeigt ein starkes Signal und macht deutlich, dass das Protein nahezu in Reinform vorliegt.



**Abbildung 41:** ESI-Massenspektrum: Ermittlung des exakten Molekulargewichts der mit einem *Strep*-tag II® versehenen mQTRTD1v1 mit Hilfe von ESI-MS ( $V_{\text{ESI}} = 1,5$  kV, bP = 0,5 psi,  $V_c = 30$ ,  $P_i = 1$  mbar)

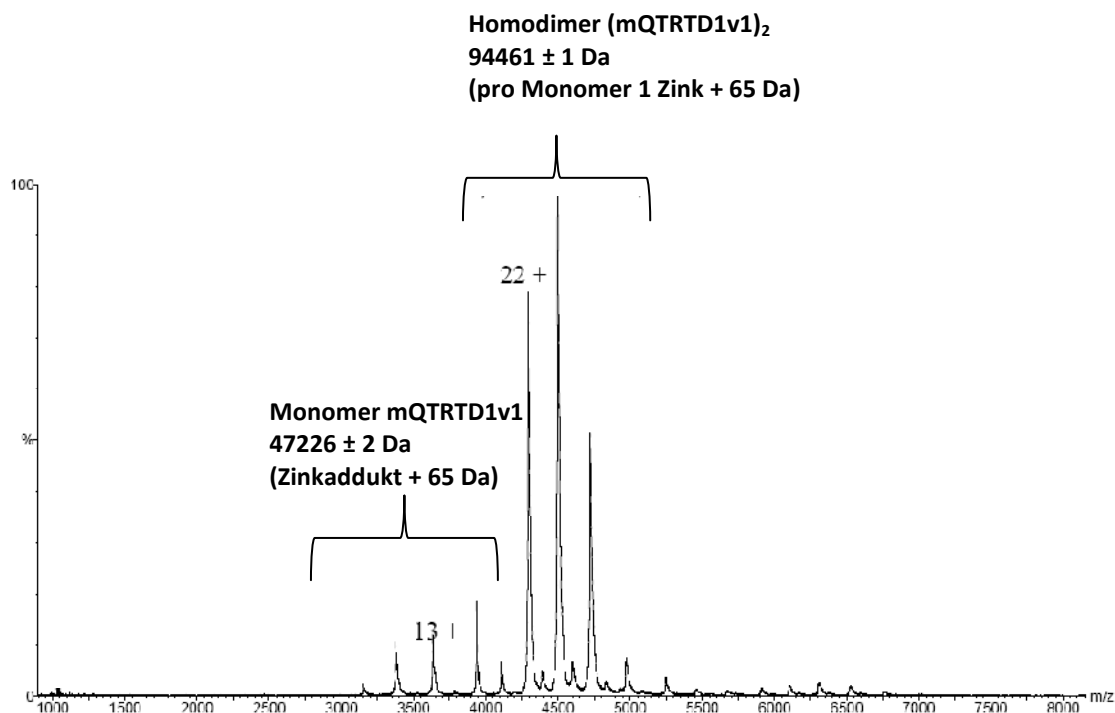
Die proteolytische Abspaltung des *Strep*-tag® II erfolgte wie bei der katalytischen Unterheit durch biotinyliertes Thrombin (Abschnitt 3.3.2.4). Um die vollständige Abspaltung des *Strep*-tag® II zu verifizieren und um das exakte Molekulargewicht nach der *Strep*-tag® II-Entfernung sowie die Reinheit der Proteinpräparation zu überprüfen, wurde eine HPLC-MS durchgeführt. Das dabei ermittelte Molekulargewicht der vom *Strep*-tag® II befreiten mQTRTD1v1 von 47161 Da stimmte mit dem berechneten Molekulargewicht (ebenfalls 47161 Da) exakt überein (Abb. 42). Auch hier macht das Massenspektrum die nahezu vollständige Reinheit des Proteins deutlich.



**Abbildung 42:** ESI-Massenspektrum der vom *Strep*-tag® II befreiten mQTRTD1v1

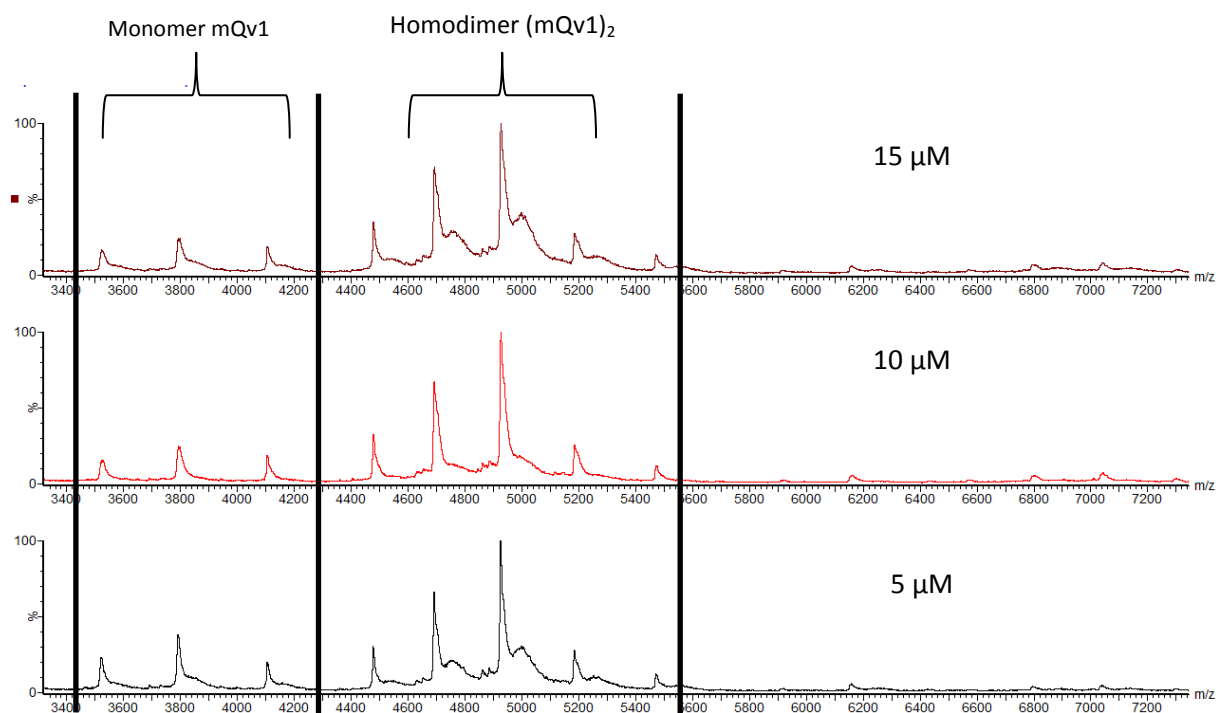
### 3.1.3.3 Untersuchung der Quartärstruktur der isolierten mQTRTD1v1 mittels NanoESI-MS unter nativen Bedingungen

Um zu ermitteln, welche Quartärstruktur die QTRTD1v1 aus der Maus in Abwesenheit des natürlichen Bindepartners QTRT1 annimmt, wurden auch mit diesem Protein nicht-fragmentierende NanoESI-MS-Experimente unter nativen Bedingungen durchgeführt. Vorbereitend wurde das Protein in einen 500 mM Ammoniumacetatpuffer pH 7,0 umgepuffert und auf Konzentrationen von 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M und 15  $\mu$ M verdünnt. Die NanoESI-MS-Experimente mit den unterschiedlich konzentrierten Proteinlösungen zeigten, dass die mQTRTD1v1 zu etwa 20 % als Monomer und zu etwa 80 % als Homodimer in Lösung vorliegt, wobei jede Polypeptidkette ein  $\text{Zn}^{2+}$ -Ion enthält (Massendifferenz: 65 Da; Abb. 43). Das Verhältnis Monomer:Homodimer ändert sich in dem eingesetzten Konzentrationsbereich des Proteins abhängig von dessen genauer Konzentration nur geringfügig (Abb. 44).



**Abbildung 43:** ESI-Massenspektrum:

NanoESI-MS-Analyse der mQTRTD1v1 unter nativen Bedingungen ( $V_{\text{ESI}} = 1,8 \text{ kV}$ ,  $bP = 0,8 \text{ psi}$ ,  $V_c = 140$ ,  $P_i = 6 \text{ mbar}$ )



**Abbildung 44:** ESI-Massenspektren: Monomer : Homodimer Verhältnis der mQTRTD1v1 in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration ( $V_{\text{ESI}} = 1,8 \text{ kV}$ ,  $bP = 0,8 \text{ psi}$ ,  $V_c = 140$ ,  $P_i = 6 \text{ mbar}$ )

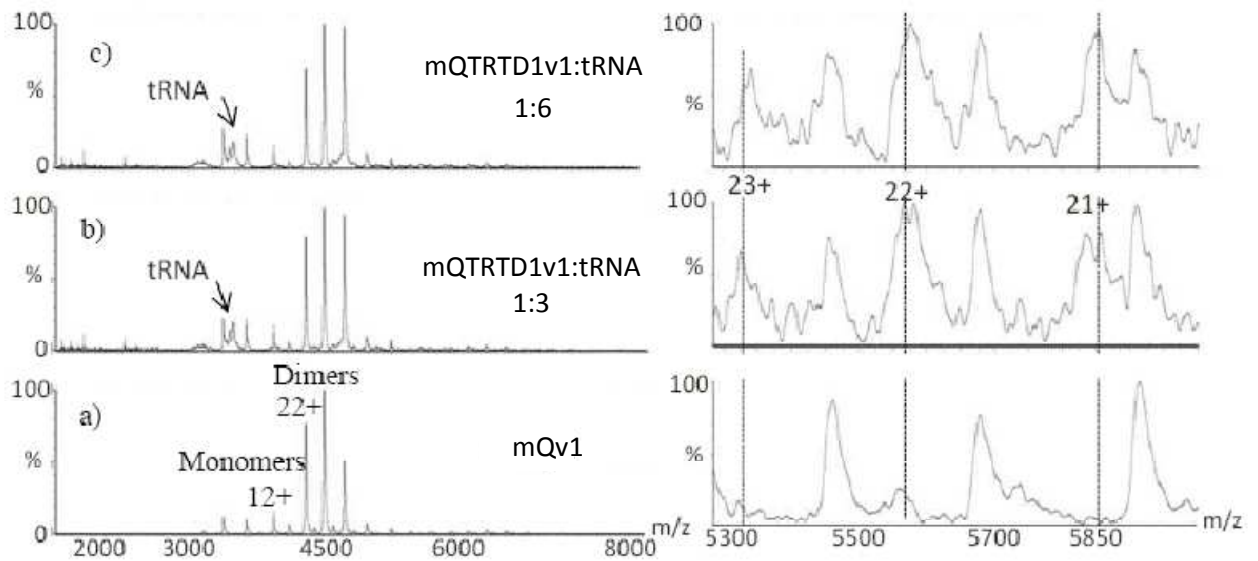
#### **3.1.3.4 Ermittlung der Enzymaktivität der mQTRTD1v1**

Um zu untersuchen, ob die mQTRTD1v1 in Abwesenheit der QTRT1-Untereinheit Enzymaktivität aufweist, wurde der in Abschnitt 3.3.8 beschriebene Assay eingesetzt. Wie zu erwarten, war die mQTRTD1v1 nicht in der Lage, [8-<sup>3</sup>H]-Guanin in die Substrat-tRNA einzubauen.

#### **3.1.3.5 Untersuchung der Substratbindung durch die mQTRTD1v1**

Im Anschluss wurde untersucht, ob die mQTRTD1v1 in der Lage ist, eines oder mehrere der TGT-Substrate zu binden. Analog zu den Studien an der katalytischen Untereinheit wurden mit dem Protein zu diesem Zweck Thermophoresemessungen (Abschnitt 3.3.10) in Anwesenheit von tRNA<sup>Tyr</sup>, preQ<sub>1</sub>, Queuin oder Guanin durchgeführt. Keines der genannten Substrate führte jedoch zu einer Änderung des Thermophoreseverhaltens.

Als weitere Option, eine mögliche Wechselwirkung des Proteins mit dem tRNA-Substrat nachzuweisen, wurden auch hier NanoESI-MS Experimente unter nativen Bedingungen durchgeführt. Vorbereitend wurden sowohl das Protein als auch die tRNA<sup>Tyr</sup> in einen 150 mM Ammoniumacetatpuffer (pH 7,0) umgepuffert. Die mQTRTD1v1 wurde bei allen Messungen in einer Konzentration von 5 µM eingesetzt, während die tRNA<sup>Tyr</sup>-Konzentration variiert wurde (0 µM, 15 µM und 30 µM). Die resultierenden Spektrogramme in Abb. 45 zeigen die ungebundene tRNA<sup>Tyr</sup> sowohl bei einer Konzentration von 15 µM (b) als auch von 30 µM (c) als Signal zwischen 3000 und 3500 m/z. Ein erkennbares Signal, das einem Komplex aus Protein und tRNA entspricht, war jedoch nicht vorhanden (siehe Abbildung 45, Zoom 5000-6000 m/z).



**Abbildung 45:** Mano-ESI-Massenspektren:

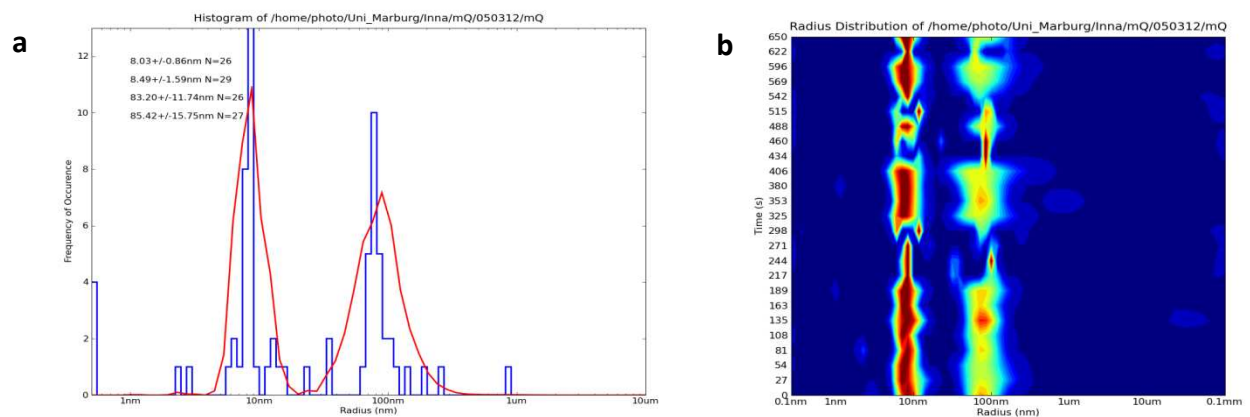
links: a: mQTRTD1v1 (5µM), b: mQTRTD1v1 (5µM) + tRNA (15 µM), c: mQTRTD1v1 (5µM) + tRNA (30 µM).

rechts: Zoom des 5000 bis 6000 m/z Bereichs, Linien repräsentieren eine mögliche Interaktion der zwischen mQTRTD1v1 und tRNA im Verhältnis 1:3. ( $V_{\text{ESI}} = 1,8 \text{ kV}$ ,  $bP = 0,8 \text{ psi}$ ,  $V_c = 150$ ,  $P_i = 5,5 \text{ mbar}$ ).

### 3.1 3.6 Untersuchung der mQTRTD1v1 mittels DLS

Um die Dispersität der mQTRTD1v1 in Lösung zu untersuchen, wurden auch mit diesem Protein DLS-Messungen durchgeführt. Wie im Fall der QTRT1 aus Mensch und Maus wurde auch die mQTRTD1v1-Lösung für 5 min bzw. für 60 min mit  $16000 \times g$  bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert bevor mit dem Überstand die DLS-Messung erfolgte. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abb. 46 und 47 als Histogramm (jeweils a) und in der *carpet*-Darstellung (jeweils b) gezeigt. Es ist zu erkennen, dass auch bei der mQTRTD1v1 nach nur 5 min Zentrifugation eine polydisperse Lösung vorliegt. Neben dem freien ungebundenen Protein mit einem Radius von unter 10 nm (kleinerer Peak in der Histogrammdarstellung, dünner schwach ausgeprägter Streifen in der *carpet*-Darstellung) liegen größere Proteinaggregate mit einem Radius von etwa 100 nm vor (größerer Peak in der Histogrammdarstellung, dickerer Streifen in der *carpet*-Darstellung) (Abb. 46). Nach einer Zentrifugationsdauer von 60 min (Abb. 47) liegt hingegen eine komplett monodisperse Proteinlösung vor, die neben dem freien ungebundenen Protein mit einem Radius von unter 10 nm praktisch keine größeren Aggregate enthält (nur ein Peak in der Histogrammdarstellung und nur ein Streifen in der *carpet*-Darstellung). Auch hier belegen die DLS-Messungen die Notwendigkeit, vor

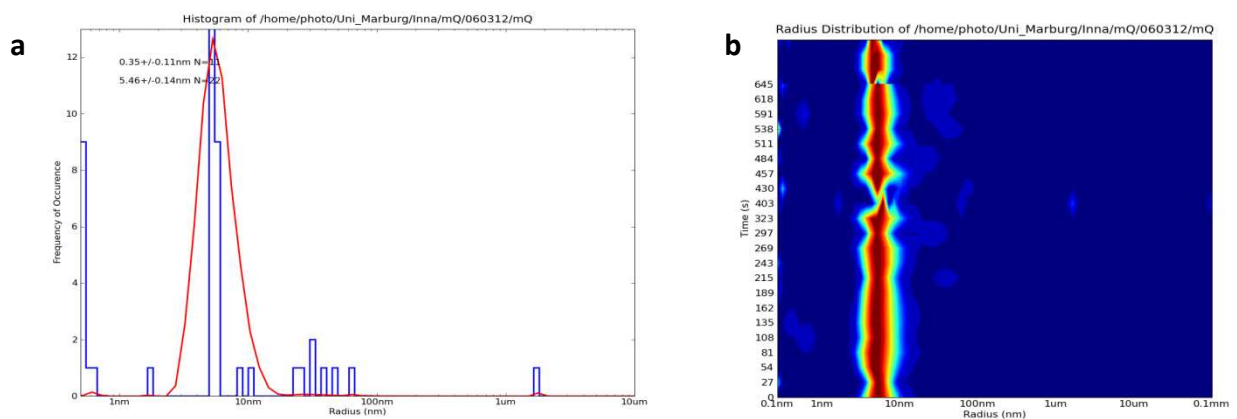
Kristallisationsversuchen die verwendete mQTRTD1v1-Lösung für wenigstens 60 min bei  $16000 \times g$  zu zentrifugieren.



**Abbildung 46:** Dynamische Lichtstreuung der mQTRTD1v1-Lösung nach 5 min Zentrifugation bei  $16000 \times g$ ;

a: Histogrammdarstellung der Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung

b: *carpet* - Darstellung der Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung.



**Abbildung 47:** Dynamische Lichtstreuung der mQTRTD1v1-Lösung nach 60 min Zentrifugation bei  $16000 \times g$ ;

a: Histogrammdarstellung der Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung

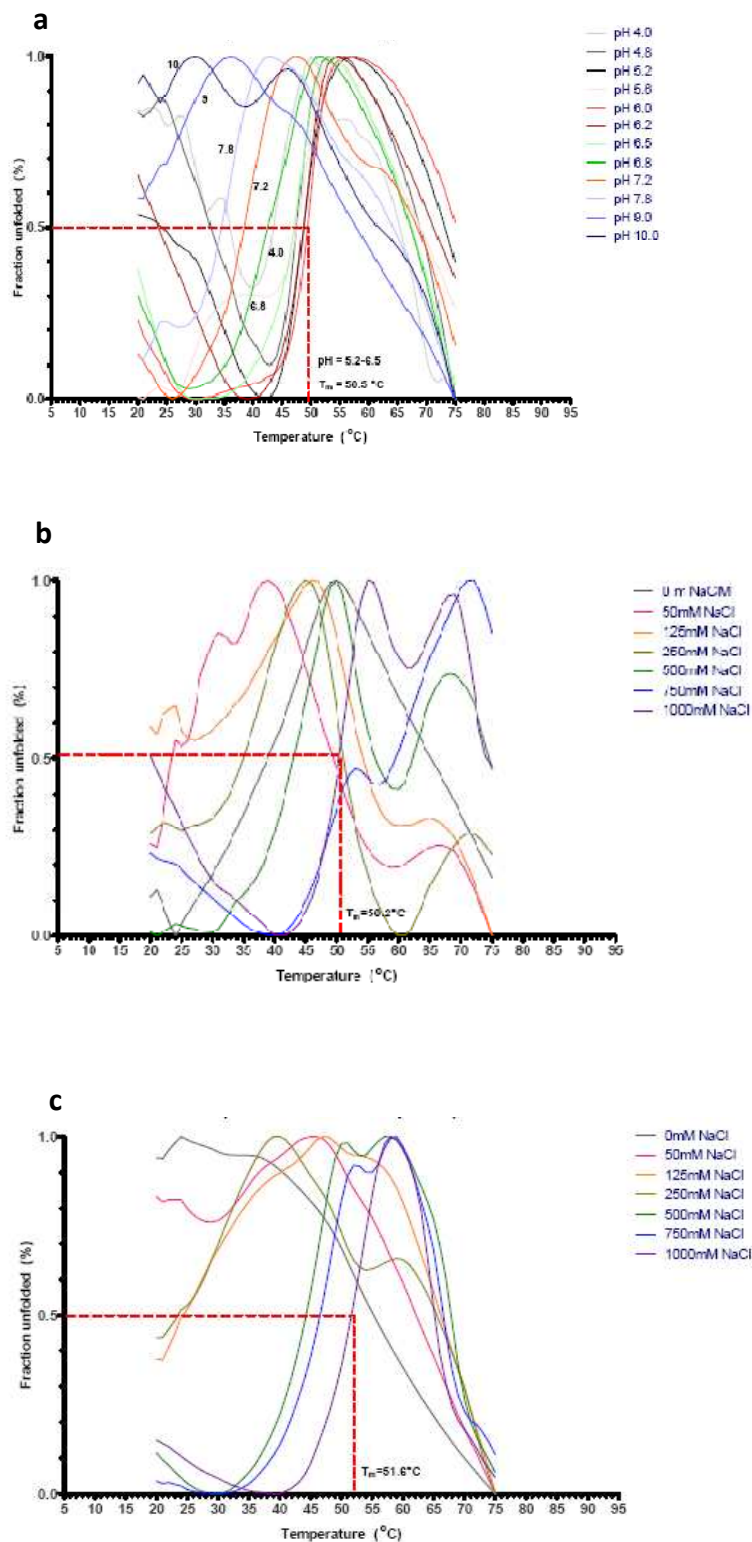
b: *carpet*-Darstellung der Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung.

### 3.1.3.7 Stabilitätsuntersuchungen an der mQTRTD1v1 mit Hilfe des Thermal Shift Assays

Wie bereits erwähnt, ist es möglich mit dem *Thermal Shift Assay* (Abschnitt 3.3.13) den Einfluss verschiedener Puffersysteme und Additive auf die Stabilität eines Proteins zu ermitteln. Von Dr. Stephane Boivin (EMBL, Hamburg) wurden zahlreiche Puffer daraufhin getestet, ob sie auch eine Änderung der  $T_m$  der mQTRTDv1 bewirken. Die Ausgangslösung,



welche für die Messungen eingesetzt wurde, enthielt das Protein in einer Konzentration von 35  $\mu\text{M}$  in 20 mM HEPES pH 7,9 und 100 mM NaCl. Die *Thermal Shift*-Messungen ergaben, dass das Protein in einem pH-Bereich zwischen 6,0 und 8,0 die höchste Stabilität zeigt (Abb. 48a). Die Abbildungen 48b und 48c machen deutlich, dass auch bei der mQTRTD1v1 NaCl in einer Konzentration von 1,0 M zu einer signifikanten Erhöhung der  $T_m$  führt. Als Puffersystem, welches das Protein optimal stabilisiert, wurde schließlich 50 mM HEPES pH 7,5, 1,0 M NaCl und 2 mM DTT ermittelt.



**Abbildung 48:** Thermal Shift Assay mit der mQTRTD1v1.

a: **Zitronensäure-, Ches-, HEPESpuffer** im einem Bereich von pH 4 bis pH 10

b: **50 mM HEPES pH 7,5 plus Natriumchlorid in verschiedenen Konzentrationen:** von oben: 0 mM, 50 mM, 125 mM, 250 mM, 500 mM, 750 mM, 1000 mM

c: **50 mM Tris pH 8,0 plus Natriumchlorid in verschiedenen Konzentrationen:**  
von oben: 0 mM, 50 mM, 125 mM, 250 mM, 500 mM, 750 mM, 1000 mM

### 3.1.3.8 Kristallisationsstudien mit der mQTRTD1v1

Um Kristallisationsbedingungen für die mQTRTD1v1 zu ermitteln, wurden insgesamt 2880 verschiedene Lösungen aus *Inhouse*-Kristallisations-Screens (Tabelle 9) sowie Kristallisations-Screens der Firma Qiagen (Tabelle 10) mit der Methode der Dampfdiffusion (sitzender Topfen) getestet. Keiner der eingesetzten *Inhouse*-Screens enthielt eine Lösung, die zur Bildung von mQTRTD1v1-Kristallen führte. Dagegen lieferten die Bedingungen PACT H9 (72), Cryo E1 (5), Cryo D9 (68), Cryo G11 (87), Cryo D12 (92) und JCSG Core 3 F 11 (86) Kristalle, die sich morphologisch stark ähnelten. Die Kristalle ließen sich mit dem Proteinfarbstoff *Izit crystal dye* (Hampton Research) anfärben und erwiesen sich als reproduzierbar. Sie weisen eine lange Quaderform auf und wachsen aus einem Keimkristall heraus zu einem Kristallbündel, wobei die langen Quader weitgehend separiert vorliegen und nur an der Stelle der Kristallkeimbildung miteinander verbunden sind (Abb. 49). Besonders große Kristalle lieferte die Bedingung H9 aus dem PACT Screen (0,2 M Natriummalonat, 0,1 M Bistrispropan pH 6,5, 25 % PEG 3350). Während des Versuchs diese Kristalle durch Variieren der PEG 3350- und Natriummalonat-Konzentration zu optimieren wurde deutlich, dass lediglich frisch präpariertes Protein innerhalb von drei Tagen Kristalle lieferte. Auch schockgefrorenes Protein, das länger als 6 Monate bei -80°C gelagert worden war, zeigte keine Tendenz zu kristallisieren. Erst nachdem Thermal Shift-Experimente gezeigt hatten, dass das Protein in Hochsalzpuffer besonders stabil vorliegt und der Puffer, in dem das Protein gelöst war, entsprechend geändert worden war (50 mM HEPES pH 7,5, 1 M NaCl, 2 mM DTT anstelle von 10 mM Hepes pH 7,0, 100 mM NaCl, 2mM DTT) wurde es möglich, auch schockgefrorenes und über längere Zeit gelagertes Protein zu kristallisieren. Dabei war die Reservoiirlösung nach wie vor identisch mit der Lösung, die zu ersten Kristallen geführt hatte. Versuche, die Qualität dieser Kristalle durch die Zugabe von 100 mM Ectoin oder verschiedener Additive aus den Additive-Screens der Firma Hampton Research (Tabelle 11) zu optimieren, brachten leider nicht den gewünschten Erfolg. Kristalle, die sich von den eben

erwähnten äußerlich deutlich unterschieden, wurden mit der Bedingung MbClass II F2 (14) erhalten. Da sich diese Kristalle mit dem *Izit crystal dye* jedoch nicht anfärben ließen und darüber hinaus eine äußerst mangelhafte Morphologie aufwiesen (Abb. 49), wurden sie im weiteren Verlauf dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

Nachdem die Reproduktion der mQTRTD1v1-Kristallisation mit der Bedingung PACT H9 (72) erfolgreich war, musste für die Datensammlung eine geeignete Lösung für das Einfrieren der Proteinkristalle in flüssigem Stickstoff gefunden werden. Die Zugabe von 5%, 10%, 15% und 20% Glycerol zur Mutterlauge resultierte zunächst in einem Verlust der Streufähigkeit der Proteinkristalle und in Eisringen im Diffraktionsbild. Schließlich wurde mit einem Kryopuffer, der 35% PEG 3350, 0,2 M Natriummalonat und 0,1 M Bistrispropan pH 6,5 enthielt, eine Bedingung gefunden, die weder Eisringe noch den Verlust der Streufähigkeit der Kristalle zur Folge hatte. An unserem hauseigenen Röntgendiffraktometer, das mit der Röntgenröhre I $\mu$ S der Firma Incoatec und einem Mar345-Detektor ausgestattet ist, lieferten die getesteten Kristalle jedoch nach wie vor nur wenige Reflexe. Schließlich wurde an der Beamline 14.1 des Synchrotrons BESSY II (Helmholz-Zentrum, Berlin) neben einem nativen Datensatz mit einer Auflösung von 2,77 Å ein Peakdatensatz bei der Wellenlänge der Zinkabsorptionskante mit einer Auflösung von 3.1 Å gesammelt. Ein im Vorfeld durchgeführter Zinkscan (Abb. 50) hatte das Vorhandensein eines Zn<sup>2+</sup>-Ions, welches bereits durch NanoESI-MS (s. Abschnitt 3.1.2.4) gezeigt worden war, bestätigt.

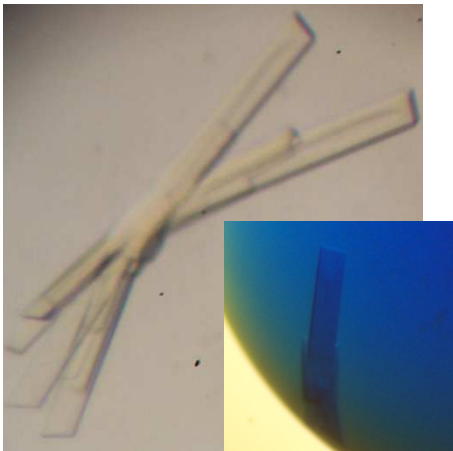
Inhouse-screens	Proteinkonzentration [mg/mL]	Pufferr	Temperatur [° C]	Bemerkung
Cryo I 1-48	6	10 mM Tris, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, pH 7,0	18	+Strep-tag kein Hit
Cryo II 1-48				
PEG/Ionen 1-48				
Wizard I 1-48				
Wizard II 1-48				
Crystal Screen 1-48				

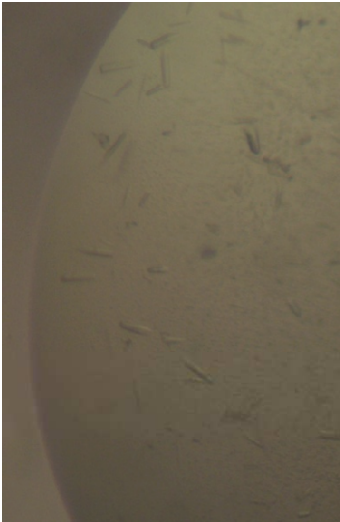



**Tabelle 9:** Inhouse Kristallisations-Screens, die für Kristallisationsversuche mit der mQTRTD1v1 eingesetzt wurden.

Pipetierroboter-screens Cartesian Microsys™ SQ 4000 / "honey bee"	Proteinkonzentration [mg/mL]	Puffer	Temperatur [° C]	Bemerkung
Cryos Suite*	6	10 mM Tris, 100 mM NaCl, 2 mM	18	+Strep-tag
Classics Suite*				

Classics lite Suite*		DTT, pH 7,0		
Anions Suite*				
PACT Suite*				
JCSG+ Suite*				
MbClass Suite*				
MbClass II Suite*				
Cryos Suite*	6	20 mM HEPES, 500 mM NaCl, 2 mM DTT, pH 7,0	18	-Strep-tag
Classics Suite*				
Classics lite Suite*				
Anions Suite*				
PACT Suite*				
JCSG+ Suite*				
MbClass Suite*				
MbClass II Suite*				
Cryos Suite*	3	20 mM HEPES, 500 mM NaCl, 2 mM DTT, pH 7,0	18	-Strep-tag
Classics Suite*				
Classics lite Suite*				
PACT Suite*				
JCSG+ Suite*				
JCSG Core I Suite*				
JCSG Core II Suite*				
JCSG Core III Suite*				
JCSG Core IV Suite*				
MbClass Suite*				
MbClass II Suite*				

**Tabelle 10:** Kristallisations-Screens der Firma Qiagen, die für Kristallisationsversuche mit der mQTRTD1v1 eingesetzt wurden (eingesetzter Pipettierroboter: Cartesian Microsys™ SQ 4000 / “honey bee”).

Kristallbild	Bedingung	“Izit crystal dye”(Hampton Research)	Reproduktion
	<u>PACT H 9 (72):</u> 0,2 M Natriummalonat 0,1 M Bistrispropan, pH 6,5 25 % PEG 3350 <b>Proteinkonzentration:</b> <b>3 und 6 mg/mL</b>	→ positiv	→ gelungen

	<p><u>Cryo E 1 (5):</u>  0,085 M HEPES, pH 7,5  8,5 % Isopropanol  15 % Glycerol  17 % PEG 4000  <b>Proteinkonzentration:</b>  <b>6 mg/mL</b></p>	→ positiv	→ nicht gelungen
	<p><u>Cryo D 9 (68):</u>  0,16 M Magnesiumacetat  0,08 M Natriumcacodylat  16 % PEG 8000  20 % Glycerol  <b>Proteinkonzentration:</b>  <b>3 mg/ml</b></p>	→ positiv	
	<p><u>Cryo G 11 (87):</u>  0,17 M Ammoniumacetat  0,085 M Trinatriumcitrat  pH 5,6  25,5 % PEG 400  15 % Glycerol  <b>Proteinkonzentration:</b>  <b>3 und 6 mg/mL</b></p>	→ positiv	
	<p><u>Cryo D 12 (92):</u>  0,17 M Ammoniumacetat  0,085 M MES pH 6,5  25,5 % PEG 5000 MME  15 % Glycerol  <b>Proteinkonzentration:</b>  <b>3 und 6 mg/mL</b></p>	→ positiv	→ gelungen



	<u>JCSG Core 3 F 11 (86):</u> 0,2 M Calciumchlorid 0,1 M Matriumacetat pH 4,6 20 % Isopropanol <b>Proteinkonzentration:</b> <b>3 mg/mL</b>	→ positiv	
	<u>MbClass II F 2 (14):</u> 0,1 M Tris , pH 8,5 1,5 M Lithiumsulfat <b>Proteinkonzentration:</b> <b>6 mg/mL</b>	→ negativ	→ gelungen

Abbildung 49: Proteinkristalle der mQTRTD1v1

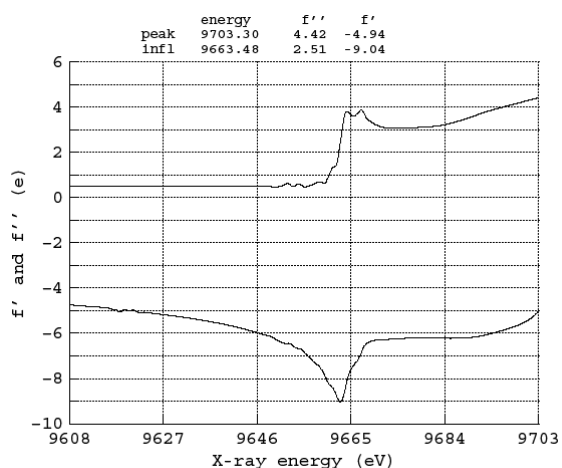


Abbildung 50: Zinkscan an einem mQTRTD1v1-Kristall

Additive Screen	Proteinkonzentration [mg/mL]	Puffer	Temperatur [° C]	Bemerkung
Bio Silver Bullet	5,2	PACT 72: 0,1 M Bistrispropan pH 6,5 0,2 M Natriummalonat 25 % PEG 3350	18	-Strep-tag
HT Silver Bullet				
Hampton Research 1-96	4			
100 mM Ectoin	8			

**Tabelle 11:** An der mQTRTD1v1 getestete Additiv-Screens (Hampton Research). Pipetierrobotor: Cartesian Microsys™ SQ 4000 / "honey bee" und manuell pipettiert.

### 3.1.3.9 Strukturaufklärung der mQTRTD1v1

Prozessierung und Skalierung der gesammelten Daten zeigten, dass die mQTRTD1v1-Kristalle dem orthorhombisch primitiven Bravaisgitter mit der Symmetrie  $P2_12_12$  angehören ( $a = 116,7 \text{ \AA}$ ,  $b = 124,8 \text{ \AA}$ ,  $c = 61,9 \text{ \AA}$ ;  $\alpha = \beta = \gamma 90^\circ$ ). Der berechnete Matthews-Koeffizient beträgt  $2,44 \text{ \AA}^3/\text{Dalton}$ , was bei zwei mQTRTD1v1-Molekülen in der asymmetrischen Einheit einem Lösungsmittelanteil von 49,7 % entspricht.

Zunächst wurde der Versuch unternommen, das Phasenproblem bei der Strukturaufklärung mit dem Programmpaket HKL2map [Pape & Schneider, 2004] mittels des anomalen Signals des Datensatzes, welcher an der Zinkabsorptionskante gemessen worden war, zu lösen. Jedoch erwies sich das anomale Signal, welches erst bei einer Auflösung von etwa  $6 \text{ \AA}$  detektierbar war, als dafür zu schwach. Deshalb wurde im Anschluss versucht, die Struktur mit dem Programm PHASER [McCoy et al., 2007] durch die Methode des Molekularen Ersatzes (*Molecular Replacement*) zu lösen. Im Vorfeld war die *Protein Data Bank* (PDB) mit dem Programm BLAST [Altschul et al., 1997] auf Proteine mit signifikanter Aminosäuresequenzhomologie zur mQTRTD1v1 durchsucht worden (Abb. 51). Dabei hatte sich gezeigt, dass von allen Proteinen, deren Strukturen in der PDB deponiert waren, die TGT aus *Thermotoga maritima* (PDB-Code 2ASH) mit einer Sequenzidentität von 26 % die höchste Homologie zur mQTRTD1v1 aufwies. Die Koordinaten dieser Struktur wurden daher als Modellkoordinaten für den Molekularen Ersatz eingesetzt. Zuvor wurden jedoch alle Wassermoleküle sowie vermutlich flexible Schlaufenregionen entfernt (Abb. 53 a). Um eine Modellverzerrung bei der Strukturlösung aufgrund der relativ niedrigen Sequenzidentität zu vermeiden, wurde darüber hinaus mit dem Programm MOLEMAN eine Polyalaninkette des modifizierten Modells [Kleywegt et al., 2001] generiert. Mit Hilfe des Programms PHASER [McCoy et al., 2007] und des modifizierten Modells (Abb. 53 b und c) gelang es schließlich eine interpretierbare Elektronendichtekarte zu berechnen (LLG: 71,2; TFZ: 7,2). In diese Elektronendichtekarte wurde anschließend mit dem Programm AutoBuild (*Automated Model Building and Rebuilding*) [Terwilliger et al., 2008] aus dem Programmpaket PHENIX [Adams et al. 2010] die Struktur anhand der Aminosäuresequenz der mQTRTD1v1 gebaut und im Anschluss verfeinert (Abschnitt 3.3.24). Zwischen den Verfeinerungszyklen wurde die Struktur der  $2F_0-F_c$ - sowie  $F_0-F_c$  Elektronendichte mit dem Programm COOT [Emsley and Cowtan 2004] angepasst sowie Wassermoleküle manuell eingefügt. Die bei einer Auflösung von  $2,77 \text{ \AA}$  verfeinerte Struktur weist einen R-Faktor von 23,1 % und einen freien R-Faktor

von 28,8 % auf. Die kristallographischen Parameter der mQTRTD1v1-Struktur sind in Tabelle 12 gezeigt.

Score = 106 bits (265), Expect = 2e-25, Method: Compositional matrix adjust.  
Identities = 79/296 (27%), Positives = 126/296 (43%), Gaps = 55/296 (19%)

```

Query 119 GGRVEMTVSKFMAIQEALQPDWFQCLSDGEASCAETTSIKRARKSVDRSLLFLDSCLRLQ 178
          G +V +      M +Q AL D              A+  +K A +  R L      + +
Sbjct 128 GSKVFLNPEISMENVQIALGSDICMVFDHCPVPDADYEEVKEATERTYRWALRSKKAFKTE 187

Query 179 EESEVLQKSVIIGVIEGGDVMEERLRSARETAKRPVGGFLLDGFQGDPAVTETR-LHL-L 236
          ++      + G+++GG  + R SA +          G+ + G      ++ E R L L +
Sbjct 188 NQA-----LFGIVQGGIYPDLRRESALQLTSIGFDGYAIGGL----SIGEERSLTLEM 236

Query 237 SSVTAE-LPEDKPRICGVSRPDEVLECIERGVDLFESFFPYQVTERGCALTFTFDCQLN 295
          + VT E LPEDKPR  G  P+ +LE ++RGVD+F+S FP ++  G ALT+
Sbjct 237 TEVTVEFLPEDKPRYFMGGSPELILELVDRGVDMFDSVFPTRIARHGTALTW----- 289

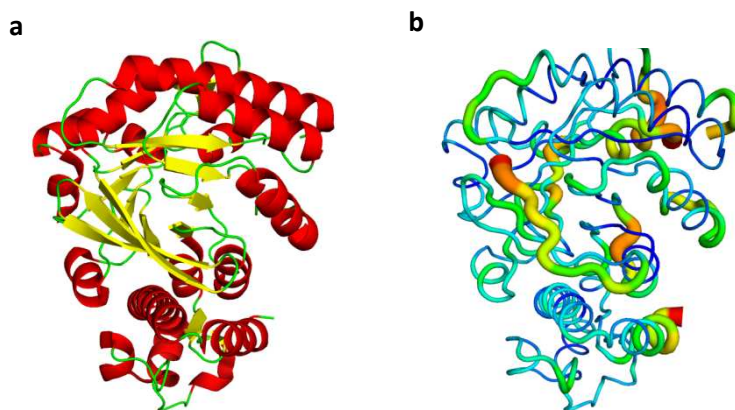
Query 296 PEETLLQQNGIQEKIKGLDQAKKIEATGCNQEMTSFEINLKEKKYQEDFDPLVRGCSCYC 355
          NG                      ++NLK  +  +P+  C CY
Sbjct 290 -----NG-----KLNLKASYNKRSLEPVDERCGCYT 315

Query 356 CKNHTRAYIIHLLMTNELLAGVLLMMHNFHYFGFFCSIREALKNDTLAQLKELIC 411
          CKN TR+YIHHL  E+L +LL +HN          +R +++++ T +LK  +
Sbjct 316 CKNFTRSYIHHLFDRGEVLGQILLTIHNINFMISLMKEVRRSIESGTFKELKSKVV 371

```

**Abbildung 51:** Mit dem Programm BLAST [Altschul et al., 1997] durchgeführte Modell-Suche.

Query: mQTRTD1v1 Sequenz, Sbjct: Modell 2ASH Sequenz

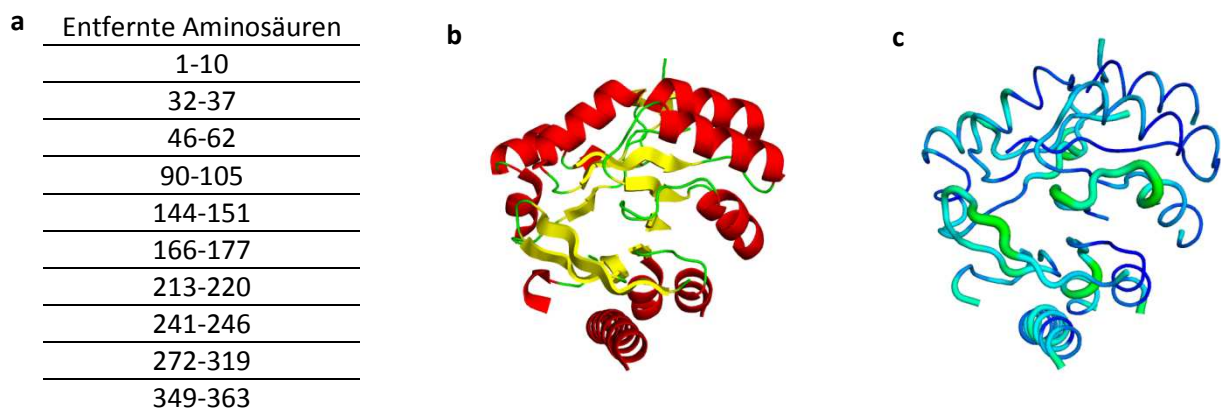


**Abbildung 52:** Modell 2ASH

a: Bänderdarstellung des Modells 2ASH.  $\alpha$ -Helices sind rot,  $\beta$ -Stränge gelb gefärbt.

b: Darstellung der B-Faktoren des Modells 2ASH. In Rottönen sind Bereiche mit einem hohen B-Faktor (flexible Bereiche) und in Blautönen Bereiche mit einem niedrigen B-Faktor (starre Bereiche) angezeigt.





**Abbildung 53:** modifiziertes Modell 2ASH

a: Entfernte Aminosäuren

b: Ribbon-Darstellung des modifizierten Modells 2ASH.  $\alpha$ -Helices sind rot,  $\beta$ -Stränge gelb gefärbt.

c: Darstellung der  $B$ -Faktoren des modifizierten Modells 2ASH. In Rottönen sind Bereiche mit einem hohen  $B$ -Faktor (flexible Bereiche) und in Blautönen Bereiche mit einem niedrigen  $B$ -Faktor (starre Bereiche) angezeigt.

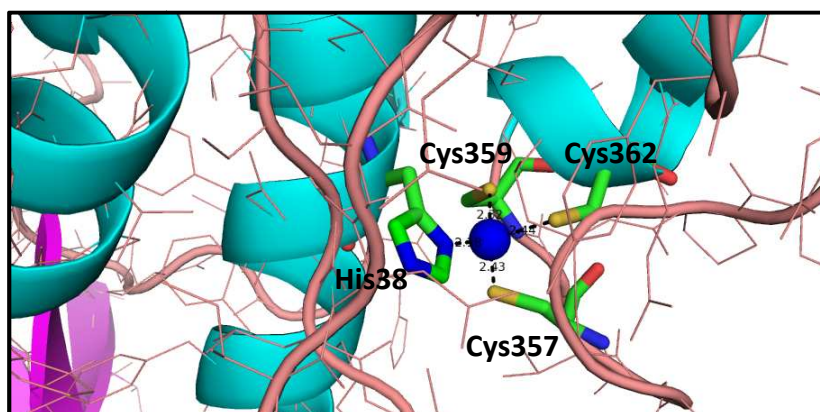
<b>Kristall</b>	mQTRTD1v1
<b>A. Datensammlung und Prozessierung</b>	
Beamline	BL 14.1
$\lambda$ (Å)	1,28259
Raumgruppe	$P2_12_12$
$a, b, c$ (Å)	116,7; 124,8; 61,9
$\alpha = \beta = \gamma$ (°)	90
Matthews-Koeffizient (Å <sup>3</sup> /Da)	2.4
Lösungsmittelgehalt (%)	49,6
Auflösungsbereich (Å)	50 – 2,77 (2,94 – 2.77)
Anzahl einzigartiger Reflexe	22079 (3325)
Vollständigkeit (%)	92,9 (88,5)
Redundanz	6,6 (5,5)
$R(I)_{\text{sym}}^{a,b}$ (%)	10,0 (62,8)
$I/\sigma(I)^a$	16,2 (2,6)
<b>B. Strukturverfeinerung</b>	
Programm	Phenix
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$ (%)	23,05 / 28,82
Anzahl der Aminosäuren	731
Anzahl der Wassermoleküle	2
Ramachandran Plot	
Aminosäuren in bevorzugten Regionen (%)	98,0

Aminosäuren in zusätzlichen erlaubten Regionen (%)	2,0
Durchschnittlicher <i>B</i> -Wert ( $\text{\AA}^2$ )	
Protein	54,2
Wasser	27,3
RMSD-Werte	
Bindungswinkel ( $^\circ$ )	0,7
Bindungslängen ( $\text{\AA}$ )	0,003

**Tabelle 12:** Kristallographische Tabelle zur mQTRTD1v1-Struktur

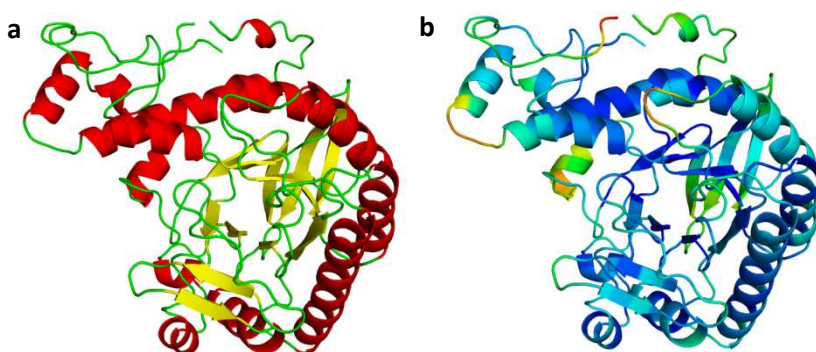
### 3.1.3.10 Gesamt- und Tertiärstruktur der mQTRTD1v1

Die asymmetrische Einheit der mQTRTD1v1-Struktur enthält zwei Polypeptidketten mit je einem gebundenen  $\text{Zn}^{2+}$ -Ion, welches durch die Thiolgruppen der Cys357-, Cys359- und Cys362-Seitenketten sowie durch den Imidazol-Stickstoff der His388-Seitenkette koordiniert wird (Abb. 54).



**Abbildung 54:** Zinkbindung in der mQTRTD1v1. Das Zinkion (blaue Kugeln) wird von den Aminosäuren Cys357, Cys359, Cys362 und His388 koordiniert.

In beiden Proteinmolekülen konnte den Aminosäureresten 1 bis 7, 297 bis 337 und 417 bis 423 keine Elektronendichte zugeordnet werden, da diese Regionen offensichtlich zu stark sind um im Kristallgitter zum Streubild konstruktiv beizutragen. Die Gesamtstruktur besteht aus dem von der bakteriellen TGT bekannten irregulären  $(\beta/\alpha)_8$ -Fass, welches verschiedene Insertionen aufweist und am *N*-Terminus durch ein dreisträngiges paralleles  $\beta$ -Faltblatt erweitert ist (Abb. 55).

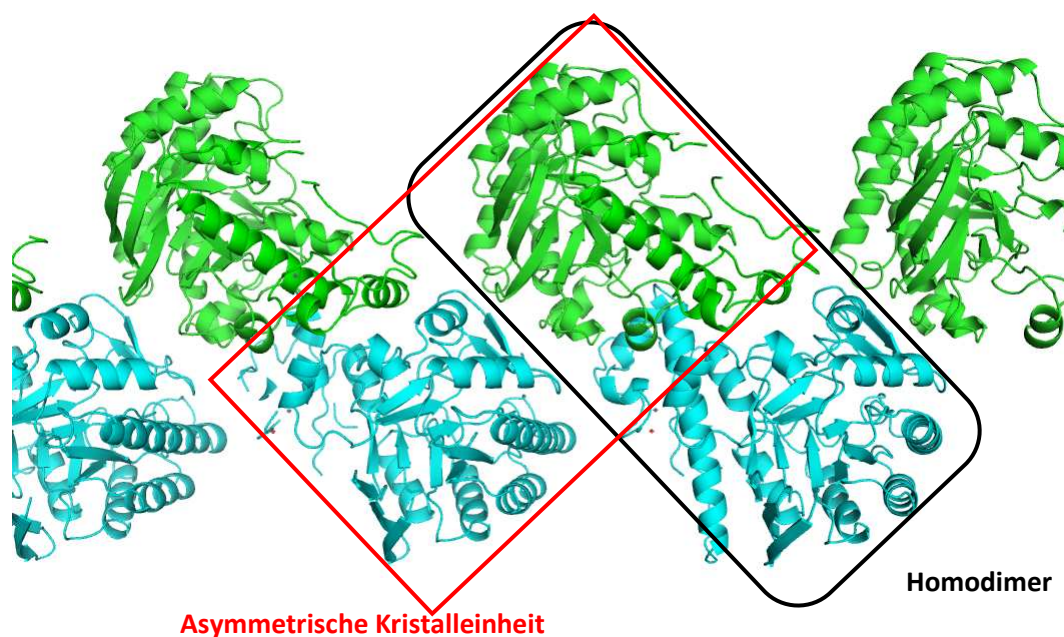


**Abbildung 55:**

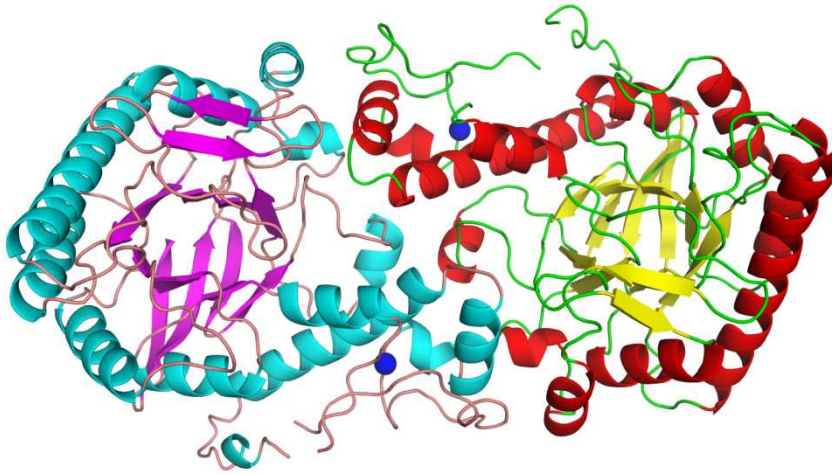
a: Bänderdarstellung der mQTRTD1v1.  $\alpha$ -Helices sind in rot,  $\beta$ -Stränge in gelb abgebildet.

b: Visualisiert der  $B$ -Faktoren des Proteins in der Kristallstruktur. Bereiche mit einem hohen  $B$ -Faktor (flexible Bereiche) sind in Rottönen, solche mit einem niedrigen  $B$ -Faktor (starre Bereiche) in Blautönen gefärbt.

Die Kontaktfläche zwischen den beiden Proteinmolekülen in der asymmetrischen Einheit ist beträgt  $1468 \text{ \AA}^2$ . Durch Anwendung der kristallographischen Symmetrie wird jedoch zweifelsfrei klar, dass die mQTRTD1v1 in dem Kristall in Form eines Homodimers vorliegt (Abb.n 56, 57), wie es bereits in NanoESI-MS-Experimenten beobachtet worden war (Abschnitt 3.1.2.4). Die Dimerkontaktfläche ähnelt in ihrem Aufbau stark der des bakteriellen TGT-Homodimers, obwohl sie mit ca.  $1400 \text{ \AA}^2$  eine etwas geringere Ausdehnung hat (Dimerkontaktfläche der bakteriellen TGT: ca.  $1650 \text{ \AA}^2$ ).

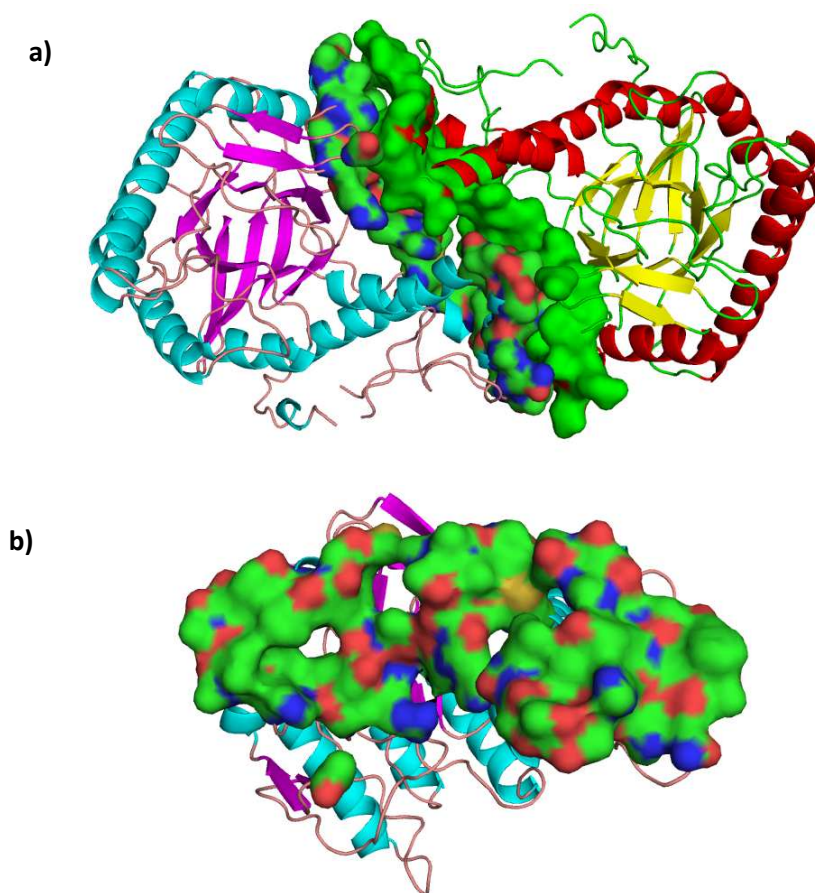


**Abbildung 56:** Zwei benachbarte asymmetrische Kristalleinheiten bilden das Homodimer.



**Abbildung 57:** Bänderdarstellung des mQTRTD1v1-Homodimers bestehend aus Kette A ( $\alpha$ -Helices hellblau und  $\beta$ -Stränge lila) und Kette B ( $\alpha$ -Helices rot und  $\beta$ -Stränge gelb). Zinkionen sind als blaue Kugeln dargestellt.

An der Ausbildung dieser Kontaktfläche sind in der vorliegenden Kristallstruktur pro Untereinheit 45 Aminosäuren (Tabelle 15) beteiligt. Sie enthält zwei Wasserstoffbrücken (His372:Thr45', Tyr360:Gln54'), die auf Grund einer zweizähligen Rotationssymmetrie zwischen den Untereinheiten jedoch zweimal auftreten. Salzbrücken werden dagegen nicht beobachtet. Abbildung 58 zeigt, dass polare und apolare Aminosäuren in der Kontaktfläche relativ gleichmäßig verteilt sind, d.h. dass weder polare noch apolare Cluster darin erkennbar sind. Die genannten Angaben wurden mit dem Programm PDBePISA [Krissinel und Henrick, 2007] ermittelt.



**Abbildung 58:** a) Oberflächendarstellung der Protein-Protein Kontaktfläche des Homodimers (mQTRTD1v1)<sub>2</sub>: in rot, blau und gelb (O, N und S) sind polare und in grün (C) apolare Bereiche zu erkennen. b) Oberflächendarstellung der Dimerkontaktfläche auf einer der beiden Untereinheiten.

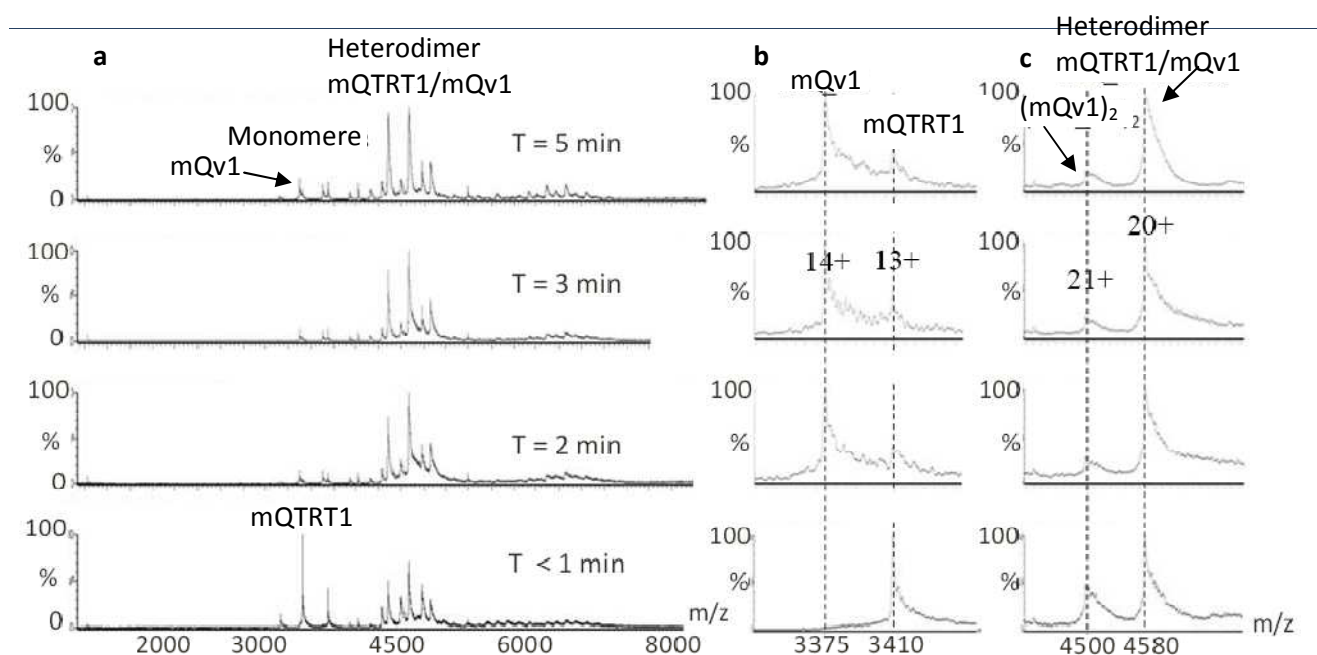
### 3.1.4 Charakterisierung des TGT-Heterodimers aus der Maus bestehend aus QTRT1- und QTRTD1v1-Untereinheit

Im anschließenden Teil der Arbeit erfolgte die biochemische Charakterisierung des funktionellen QTRT1/QTRTD1v1-Heterodimers aus der Maus. Darüber hinaus wurden damit Kristallisationsversuche als Grundlage für eine Röntgenstrukturanalyse dieses Komplexes durchgeführt. Das menschliche Ortholog der TGT fand bei den Untersuchungen keine Berücksichtigung, da die rekombinante Darstellung der katalytischen Untereinheit dieser Enzymvariante nur mit unzureichenden Ausbeuten gelungen war (s. Abschnitt 3.1.2.1).



### 3.1.4.1 Kinetik und Stöchiometrie der Quartärstrukturausbildung der Maus-TGT mittels NanoESI-MS

Um die Kinetik der QTRT1/QTRTD1v1-Heterodimerbildung zu untersuchen, wurden nichtfragmentierende ESI-MS Experimente durchgeführt. Vorbereitend dazu wurden eine QTRT1- sowie eine QTRTD1v1-Lösung getrennt voneinander in einen 250 mM Ammoniumacetatpuffer pH 7,5 umgepuffert und die Proteinkonzentration jeweils auf 5  $\mu\text{M}$  (Monomerkonzentration) d.h. im Verhältnis 1:1 eingestellt. Unmittelbar danach wurden gleiche Volumina beider Lösungen vereinigt. Nach < 1 min, 2 min, 3 min sowie 5 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde mit der resultierenden Lösung jeweils NanoESI-MS durchgeführt (Abb. 59). Die Spektren zeigen, dass bereits nach weniger als einer Minute in Anschluss an die Vereinigung der Untereinheiten neben dem QTRT1-Monomer und dem QTRTD1v1-Homodimer ein signifikanter Anteil an QTRT1/QTRTD1v1-Heterodimer vorliegt. Mit zunehmender Inkubationszeit nimmt der Heterodimeranteil zu, während der Anteil an QTRTD1v1-Homodimer und an QTRT1-Monomer abnimmt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min liegt der Hauptanteil des Proteins in Form des Heterodimers vor, während nur noch eine geringe Menge des QTRT1-Monomers detektierbar ist. Die geringe Restkonzentration an QTRTD1v1 bedingt auf Grund des Massenwirkungsgesetzes, dass diese Untereinheit nun vorwiegend als Monomer vorliegt.



**Abbildung 59:** Ermittlung der exakten mQTRT1/mQTRTD1v1-Quartärstruktur mittels ESI-MS unter nativen Bedingungen.

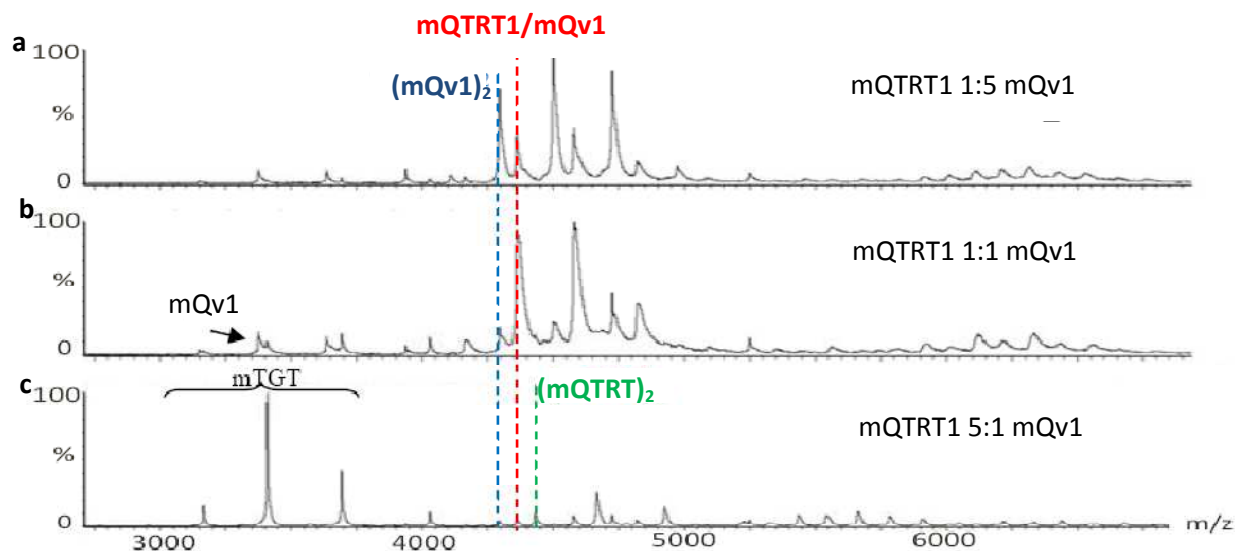
a: mQTRT1 5 $\mu$ M und mQTRTD1v1 5 $\mu$ M im Verhältnis 1:1; Inkubationszeiten: < 1min, 2 min, 3 min, 5 min.

b: Ausschnittvergrößerung des Bereichs von 3375 bis 3410 m/z; Linien repräsentieren Monomere der mQTRTD1v1 und der mQTRT1.

c: Ausschnittvergrößerung des Bereichs von 4500 bis 4580 m/z; Linien repräsentieren mQTRTD1v1-Homodimer und mQTRT1/mQTRTD1v1 Heterodimer ( $V_{\text{ESI}} = 1,8$  kV,  $bP = 0,8$  psi,  $V_c = 150$ ,  $P_i = 5,5$  mbar).

mQv1  $\equiv$  mQTRTD1v1.

Im Anschluss wurde untersucht, ob die im Heterodimer vorhandene 1:1-Stöchiometrie der Untereinheiten durch einen deutlichen molaren Überschuss von jeweils einer der beiden Untereinheiten zu einem anderen Wert hin verschoben werden kann. Zu diesem Zweck wurden die QTRT1- und die QTRTD1v1-Untereinheit im molaren Verhältnis (der Monomere) 1:1, 5:1 sowie 1:5 zusammengegeben, woraufhin die entstandenen Lösungen nach einer Inkubationszeit von 5 min mittels NanoESI-MS analysiert wurden. Wie bereits durch das vorausgehende Experiment gezeigt worden war, lag im Fall äquimolarer QTRT1- und QTRTD1v1-Konzentrationen der überwiegende Anteil des Proteins in Form des Heterodimers vor, während von den separaten Untereinheiten nur jeweils ein kleiner Anteil detektierbar war (Abb. 60b). Ein fünffacher molarer Überschuss einer der beiden Untereinheiten führte, wie zu erwarten, nicht zu einer veränderten Stöchiometrie des QTRT1/QTRTD1v1-Komplexes (Abb. 60a,c).



**Abbildung 60:** Ermittlung der mQTRT1/mQTRTD1v1-Stöchiometrie mittels ESI-MS unter nativen Bedingungen ( $V_{\text{ESI}} = 1,8$  kV,  $bP = 0,8$  psi,  $V_c = 150$ ,  $P_i = 5,5$  mbar).

a: mQTRT1 5 $\mu$ M und mQTRTD1v1 25 $\mu$ M  $\rightarrow$  Verhältnis 1:5.

b: mQTRT1 5 $\mu$ M und mQTRTD1v1 5 $\mu$ M  $\rightarrow$  Verhältnis 1:1.

c: mQTRT1 25  $\mu$ M und mQTRTD1v1 5 $\mu$ M  $\rightarrow$  Verhältnis 5:1.

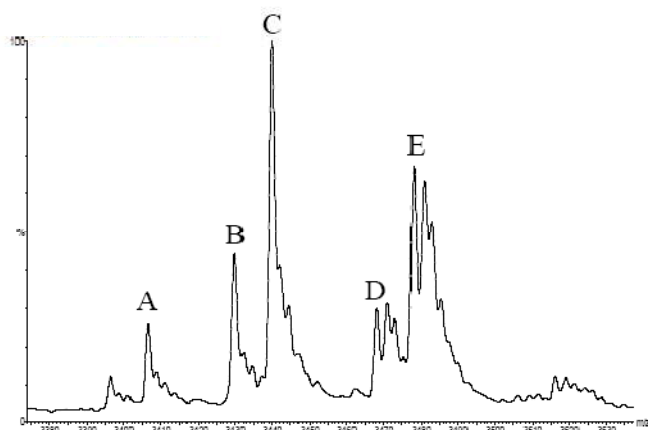
mQv1  $\equiv$  mQTRTD1v1.

### 3.1.4.2 Untersuchung der tRNA<sup>Tyr</sup>-Bindung an das TGT-Heterodimer

Weitere ESI-MS-Experimente unter nativen Bedingungen wurden durchgeführt, um die Interaktion des funktionellen TGT-Heterodimers mit dem tRNA-Substrat zu analysieren. Die Proteinproben wurden für diesen Zweck in 100 mM Ammoniumacetat pH 7,5, die tRNA in 250 mM Ammoniumacetat pH 8,0 umgepuffert. Zunächst wurde ein Massenspektrum der tRNA unter nativen Bedingungen aufgenommen. Dabei zeigte sich anhand einer nicht-einheitlichen Massenverteilung, dass in der Probe unterschiedliche tRNA-Species vorlagen, die sich im Phosphorylierungsgrad sowie am Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein bestimmter Nukleotide am 5'- bzw. 3'-Ende unterschieden (Abb. 61). Da die TGT-Erkennungsregion der tRNA von den genannten Modifikationen nicht betroffen ist, war die beobachtete Heterogenität für die folgenden Experimente jedoch kaum von Relevanz.

Um den Komplex aus TGT-Heterodimer und tRNA zu untersuchen, wurden die QTRT1-, die QTRTD1v1-Untereinheit sowie das tRNA-Substrat in einem molaren Verhältnis von 1:1:1, 1:1:2, 1:1:3 und 1:1:5 zusammengegeben und für jeweils 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Analyse der Lösungen mittels NanoESI-MS. Abb. 62a zeigt, dass bei einem äquimolaren Verhältnis der beiden Untereinheiten sowie der tRNA im Spektrogramm neben dem QTRT1-Monomer (im Bereich 3250-3750 m/z) das QTRTD1v1-Homodimer und das TGT-Heterodimer (beide im Bereich 4200-5000 m/z) sowie mit einer experimentellen molaren Masse von  $119178 \pm 9$  Da der QTRT1-QTRTD1v1-tRNA-Komplex (im Bereich 5500-7250 m/z) detektierbar sind. Dabei enthält der Komplex genau ein tRNA-Molekül pro Heterodimer. Bei zunehmendem tRNA-Anteil verschiebt sich das Gleichgewicht bezüglich der Proteinuntereinheiten mehr und mehr in Richtung QTRT1-QTRTD1v1-tRNA-Komplex, wobei sich die 1:1:1-Stöchiometrie des Komplexes auch bei einem fünffachen molaren Überschuss der tRNA bezüglich der Proteinuntereinheiten nicht ändert (Abb. 62b-d). Die Aussage, dass das eukaryotische TGT-Heterodimer gleichzeitig nur ein tRNA-Substrat binden kann, sollte folglich als gesichert gelten. Die Tatsache, dass bei zunehmendem tRNA-Anteil der Anteil an freier QTRT1 und QTRTD1v1 abnimmt, deutet vermutlich darauf hin, dass das Binden des tRNA-Substrats auf das TGT-Heterodimer einen stabilisierenden Einfluss hat.





**Abbildung 61:** ESI-Massenspektrum der tRNA unter nativen Bedingungen; theoretisches Molekulargewicht der tRNA = 27351,5 Da

( $V_{\text{ESI}} = 1,8$  kV,  $bP = 0,8$  psi,  $V_c = 120$ ,  $P_i = 6,0$  mbar)

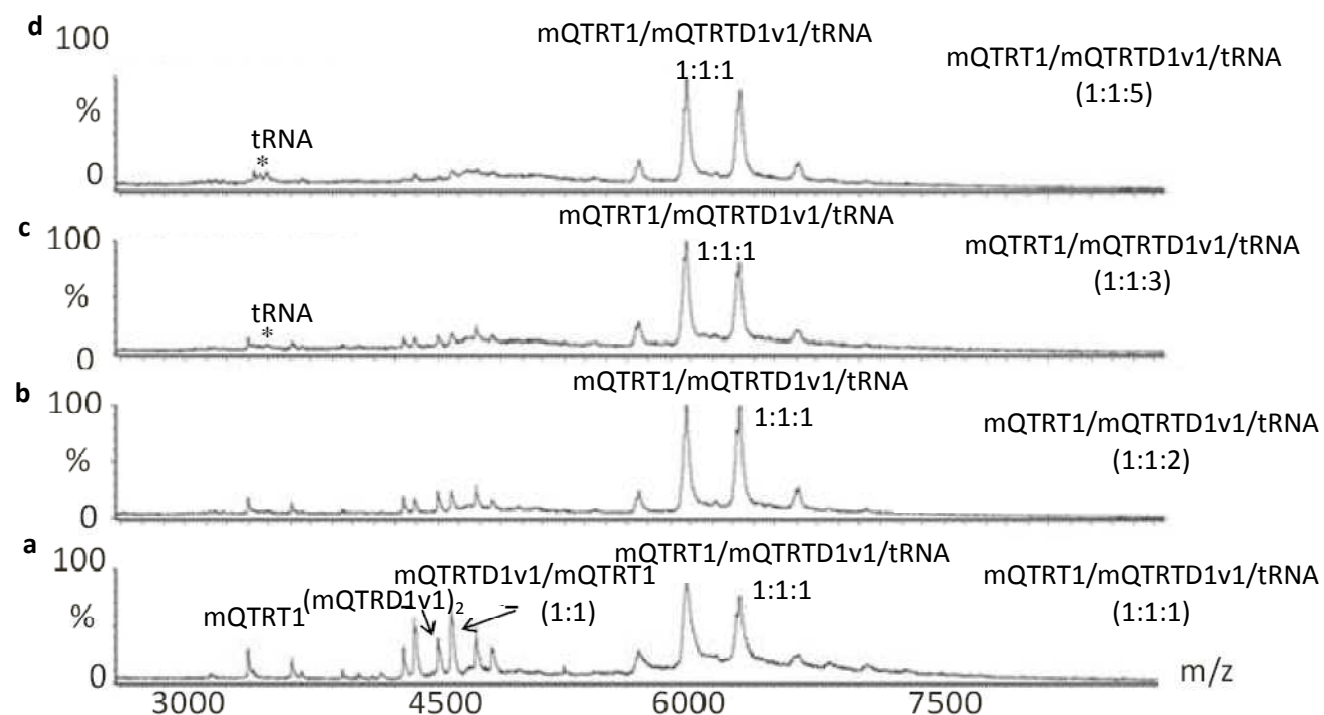
Spezies A = 27243,6 Da (-108,6 Da)  $\rightarrow$  tRNA + 2 Phosphatgruppen (5'-Ende) - A (3'-Ende)

Spezies B = 27432,1 Da (+79,9 Da)  $\rightarrow$  tRNA + 1 Phosphatgruppe (5'-Ende)

Spezies C = 27513,9 Da (+160,8 Da)  $\rightarrow$  tRNA + 2 Phosphatgruppen (5'-Ende)

Spezies D = 27735,8 Da (+383,6 Da)  $\rightarrow$  tRNA + C/U + 1 Phosphatgruppe (5'-Ende)

Spezies E = 27818,8 Da (+466,6 Da)  $\rightarrow$  tRNA + C/U + 2 Phosphatgruppen (5'-Ende)



**Abbildung 62:** ESI-Massenspektren: Bindung des tRNA-Substrats durch das mQTRT1/mQTRTD1v1-Heterodimer ( $V_{\text{ESI}} = 1,8$  kV,  $bP = 0,8$  psi,  $V_c = 150$ ,  $P_i = 5,5$  mbar).

a: mQTRT1/mQTRT1v1/tRNA im Verhältnis 1:1:1.

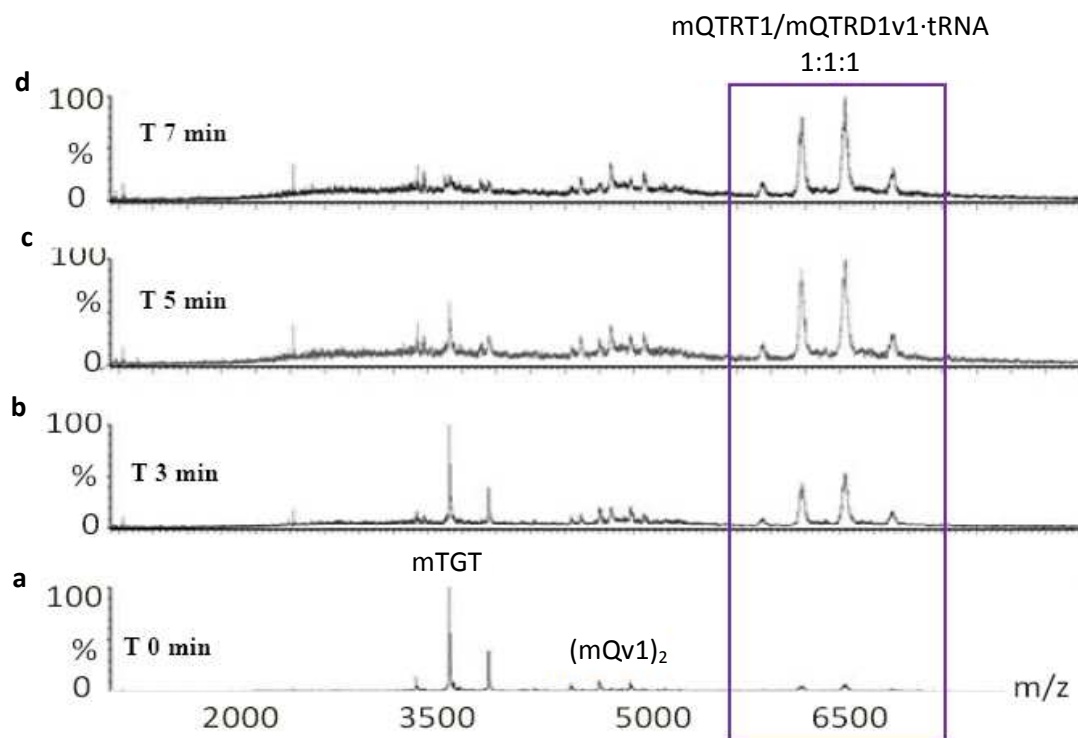
b: mQTRT1/mQTRT1v1/tRNA im Verhältnis 1:1:2.

c: mQTRT1/mQTRT1v1/tRNA im Verhältnis 1:1:3.

d: mQTRT1/mQTRT1v1/tRNA im Verhältnis 1:1:5.  
 mQv1  $\equiv$  mQTRTD1v1.

### 3.1.4.3 Kinetik der QTRTD1v1/QTRT1-tRNA-Komplex-Bildung

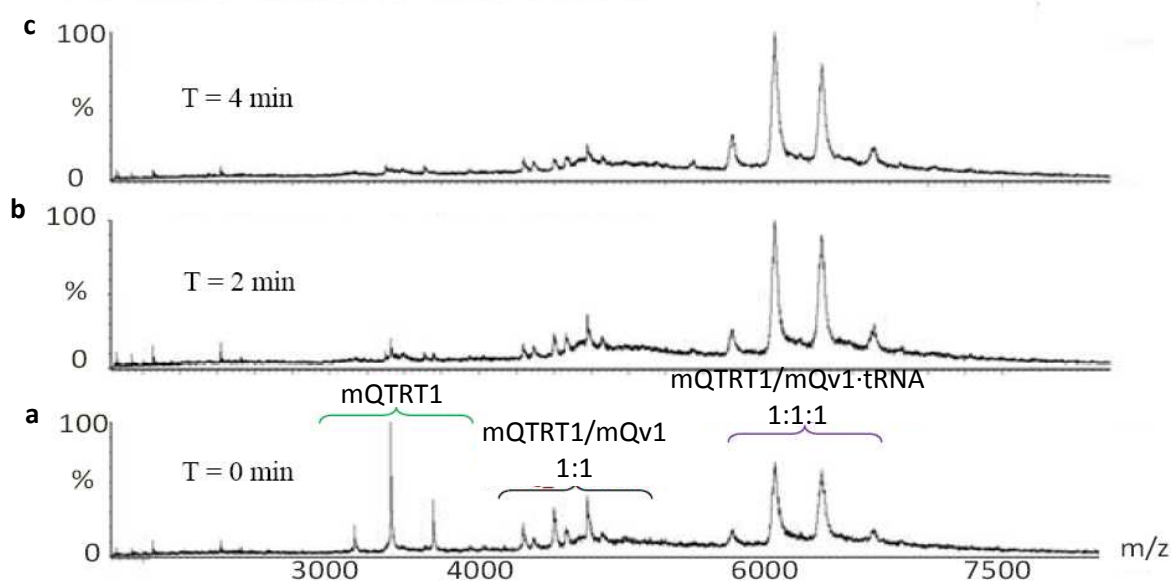
Im Anschluss wurden weitere ESI-MS Experimente unter nativen Bedingungen durchgeführt, um die Kinetik der QTRT1/QTRTD1v1-tRNA-Komplexbildung zu untersuchen. Die beiden TGT-Untereinheiten sowie die tRNA wurden zunächst in einen 250 mM Ammoniumacetatpuffer pH 7,5 umgepuffert und für die Messungen jeweils auf die benötigten Konzentrationen verdünnt. Zunächst wurden die QTRT1, die QTRTD1v1 und die tRNA im Verhältnis 1:1:3 zusammengegeben, für 0 min, 3 min, 5 min und 7 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend durch Nano-ESI-MS analysiert. Das Spektrogramm in Abb. 63a zeigt, dass unmittelbar nach Zugabe der tRNA (0 min Inkubation) lediglich das QTRT1-Monomer und das QTRTD1v1-Homodimer vorliegen und noch kein Signal für den QTRT1/QTRTD1v1-tRNA-Komplex zu erkennen ist. Nach 3 min Inkubationszeit hat sich eine deutlich sichtbare Menge des ternären Komplexes ausgebildet (Abb. 63b). Nach einer Inkubationszeit von 5 min hat sich offensichtlich das Gleichgewicht eingestellt (Abb. 63c), denn an dem Verhältnis QTRT1:(QTRTD1v1)<sub>2</sub>:QTRT1/QTRTD1v1-tRNA ist auch nach einer Inkubationszeit von 7 min keine Veränderung mehr zu beobachten (Abb. 63d).



**Abbildung 63:** ESI-Massenspektren: Kinetische Untersuchung der mQTRT1/mQTRTD1v1-tRNA-Komplexbildung mittels Nano-ESI-MS ( $V_{\text{ESI}} = 1,8$  kV,  $bP = 0,8$  psi,  $V_c = 200$ ,  $P_i = 5,5$  mbar).

- a: mTGT/ mQTRTD1v1-tRNA im Verhältnis 1:1:3, ohne Inkubationszeit.  
 b: mTGT/ mQTRTD1v1-tRNA im Verhältnis 1:1:3, Inkubationszeit 3 min.  
 c: mTGT/ mQTRTD1v1-tRNA im Verhältnis 1:1:3, Inkubationszeit 5 min.  
 d: mTGT/ mQTRTD1v1-tRNA im Verhältnis 1:1:3, Inkubationszeit 7 min.  
 mQv1  $\equiv$  mQTRTD1v1.

In einem weiteren Experiment wurden zunächst die QTRT1 und die QTRTD1v1 (Monomerkonzentration jeweils 5  $\mu$ M) zusammengegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeitspanne konnte sich bereits das QTRT1/QTRTD1v1-Heterodimer ausbilden. Anschließend wurde die tRNA in einer Konzentration von 15  $\mu$ M zu dem entstandenen Heterodimer zugegeben und die Lösung für weitere 2 min bzw. 4 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bereits unmittelbar nach Zugabe der tRNA (0 min Inkubationszeit, Abb. 64a) konnte der Komplex aus QTRT1, QTRTD1v1 und tRNA im Verhältnis 1:1:1 beobachtet werden. Gleichzeitig sind jedoch auch das QTRT1-Monomer sowie das QTRT1/QTRTD1v1-Heterodimer (30 %) detektierbar. Nach einer Inkubationszeit von 2 min ist kein QTRT1-Monomer und nur ein sehr geringer Anteil des QTRT1/QTRTD1v1-Heterodimers zu beobachten (Abb. 64b). Der ternäre QTRT1/QTRTD1v1-tRNA-Komplex ist hingegen zu einem hohen Anteil ausgebildet, der auch nach einer Inkubationsdauer von 4 min (Abb. 64c) bestehen bleibt. Die Messungen zeigen, dass das anfängliche Vorhandensein des QTRT1/QTRTD1v1-Heterodimers die Ausbildung des ternären Komplexes sichtbar beschleunigt.

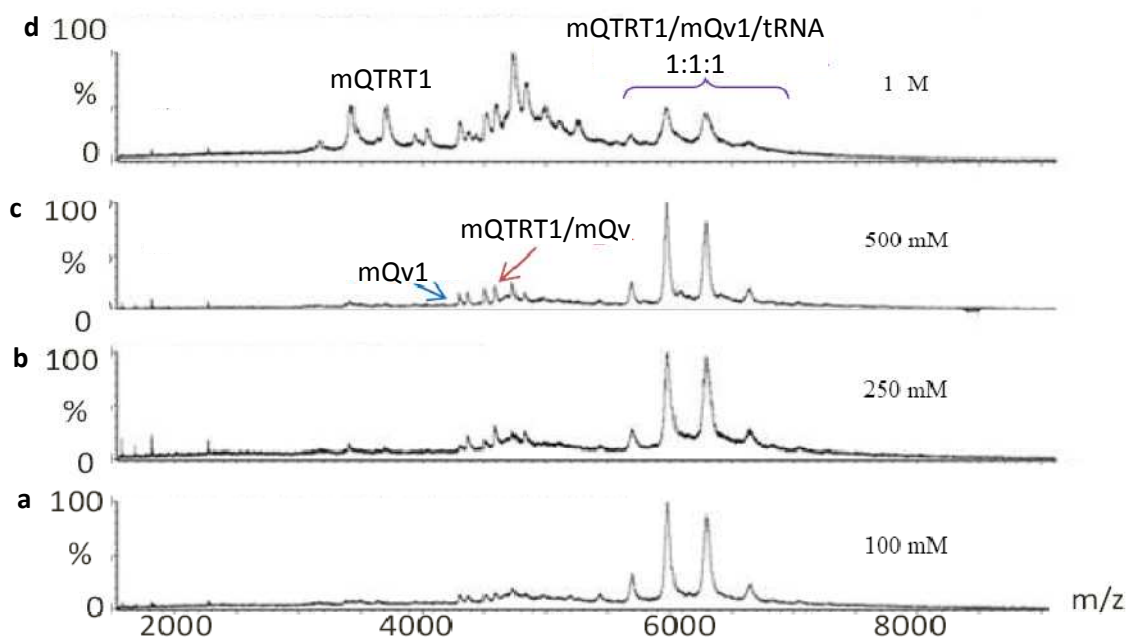


**Abbildung 64:** Nano-ESI-Massenspektren: Kinetische Untersuchung der Ausbildung des ternären mQTRT1/mQTRTD1v1-tRNA-Komplexes mittels Nano-ESI-MS ( $V_{\text{ESI}} = 1,8$  kV, bP = 0,8 psi,  $V_c = 200$ ,  $P_i = 5,5$  mbar).

- a: mQTRT1/mQTRTD1v1 im Verhältnis 1:1 + 15  $\mu$ M tRNA, Inkubationszeit 0 min.  
 b: mQTRT1/mQTRTD1v1 im Verhältnis 1:1 + 15  $\mu$ M tRNA Inkubationszeit 2 min.  
 c: mQTRT1/mQTRTD1v1 im Verhältnis 1:1 + 15  $\mu$ M tRNA Inkubationszeit 4 min.  
 mQv1  $\equiv$  mQTRTD1v1.

#### **3.1.4.4 Einfluss der Ionenstärke auf die Stabilität des QTRT1/QTRTD1v1-tRNA-Komplexes**

Schließlich wurden NanoESI-MS Experimente durchgeführt, um den Einfluss der Ionenstärke auf die Stabilität des QTRT1/QTRTD1v1-tRNA-Komplexes (1:1:1) zu untersuchen. Die beiden TGT-Untereinheiten und die tRNA wurden für diesen Zweck in einen 100 mM / 250 mM / 500 mM bzw. 1000 mM Ammoniumacetatpuffer pH 7,5 umgepuffert, für die Messungen auf die benötigte Konzentration von 5  $\mu$ M (Proteinuntereinheiten) bzw. 15  $\mu$ M (tRNA) verdünnt, zusammengegeben und für 4 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Lösungen mittels NanoESI-MS analysiert. Die Spektrogramme zeigen, dass der ternäre Komplex aus den beiden TGT-Untereinheiten und der tRNA bei einer Ammoniumacetatkonzentration zwischen 100 und 500 mM stabil ist (Abb. 65a bis c). Bei einer Ammoniumacetatkonzentration von 1000 mM hingegen verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung mQTRT1 (Monomer), mQTRTD1v1 (Homodimer) und mQTRT1/mQTRTD1v1-Heterodimer (Abb. 65d). Der Komplex verliert also offensichtlich an Stabilität und zerfällt teilweise in seine Ausgangsbausteine. Folglich ist bei weiteren Interaktionsexperimenten auf die Ionenstärke des verwendeten Puffersystems zu achten. Gegebenfalls ist das Puffersystem auszutauschen oder eine neue Methode zu wählen.



**Abbildung 65:** ESI-Massenspektren: Einfluss der Ionenstärke auf die Stabilität des ternären mQTRT1/mQTRTD1v1-tRNA-Komplexes ( $V_{\text{ESI}} = 1,8 \text{ kV}$ ,  $bP = 0,8 \text{ psi}$ ,  $V_c = 150$ ,  $P_i = 5,5 \text{ mbar}$ ).

a: mQTRT1/mQTRTD1v1/tRNA im Verhältnis 1:1:3, 100 mM Ammoniumacetat pH 7,5.

b: mQTRT1/mQTRTD1v1/tRNA im Verhältnis 1:1:3, 250 mM Ammoniumacetat pH 7,5.

c: mQTRT1/mQTRTD1v1/tRNA im Verhältnis 1:1:3, 500 mM Ammoniumacetat pH 7,5.

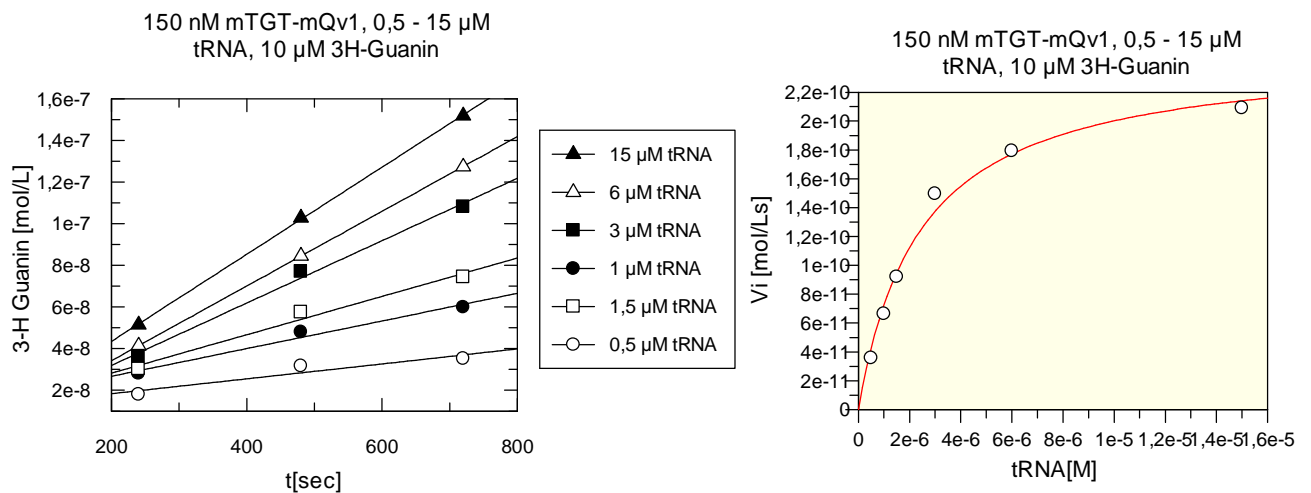
d: mQTRT1/mQTRTD1v1/tRNA im Verhältnis 1:1:3, 1000 mM Ammoniumacetat pH 7,5.

mQv1  $\equiv$  mQTRTD1v1.

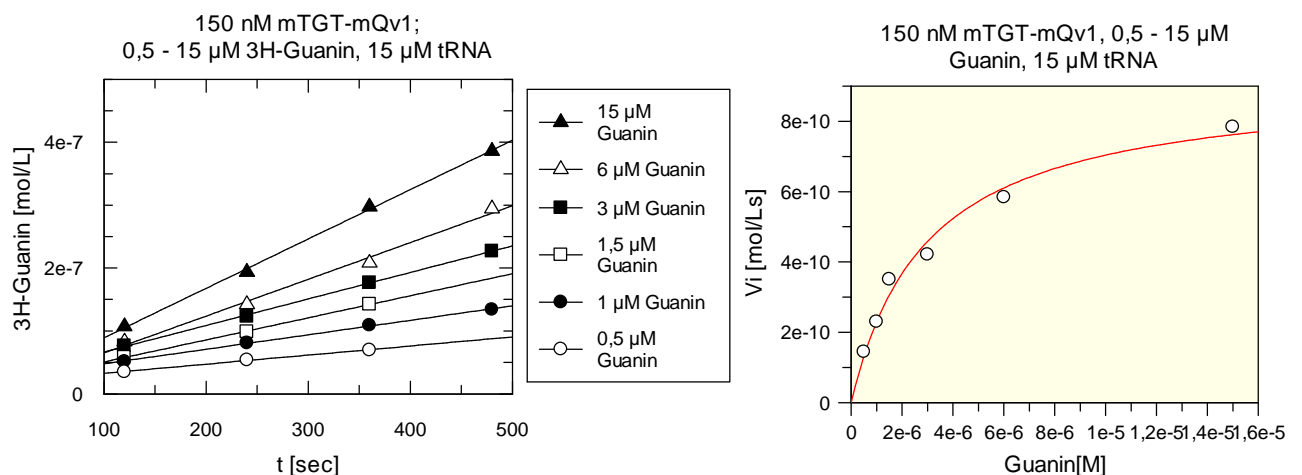
### 3.1.4.5 Kinetische Charakterisierung des TGT-Heterodimers

Die enzymkinetischen Parameter des QTRT1/QTRTD1v1-Heterodimers wurden mit dem in Abschnitt 3.3.8 beschriebenen TGT-Aktivitätsassay bestimmt. Abbildungen 66 bis 69 zeigen die gemessenen Zeitumsatzkurven sowie die daraus resultierenden Michaelis-Menten-Diagramme. Die schließlich aus den Michaelis-Menten-Diagrammen ermittelten  $k_{\text{cat}}$ - und  $K_m$ -Werte sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Die Daten zeigen, dass die Maus-TGT im Vergleich zum bakteriellen Enzym eine um etwa eine Größenordnung niedrigere Umsatzrate aufweist (s. Teil 1 dieser Arbeit). Aus den ermittelten  $K_m$ -Werten wird ersichtlich, dass sich die Affinität des Enzyms zur tRNA und zu Guanin dagegen im Rahmen der Messgenauigkeit praktisch nicht vom bakteriellen Enzym unterscheiden. Es sei angemerkt, dass von Chen et al. [2010] ähnliche Werte für die heterodimere menschliche TGT gemessen wurden. Nicht reproduziert werden konnte in der vorliegenden Arbeit dagegen die extrem niedrige Affinität zu preQ<sub>1</sub>, die in der eben erwähnten Studie für das menschliche Enzym beobachtet wurde. Während für die menschliche TGT ein  $K_m(\text{preQ}_1)$  von  $132 \mu\text{M} \pm 28 \mu\text{M}$  publiziert ist,

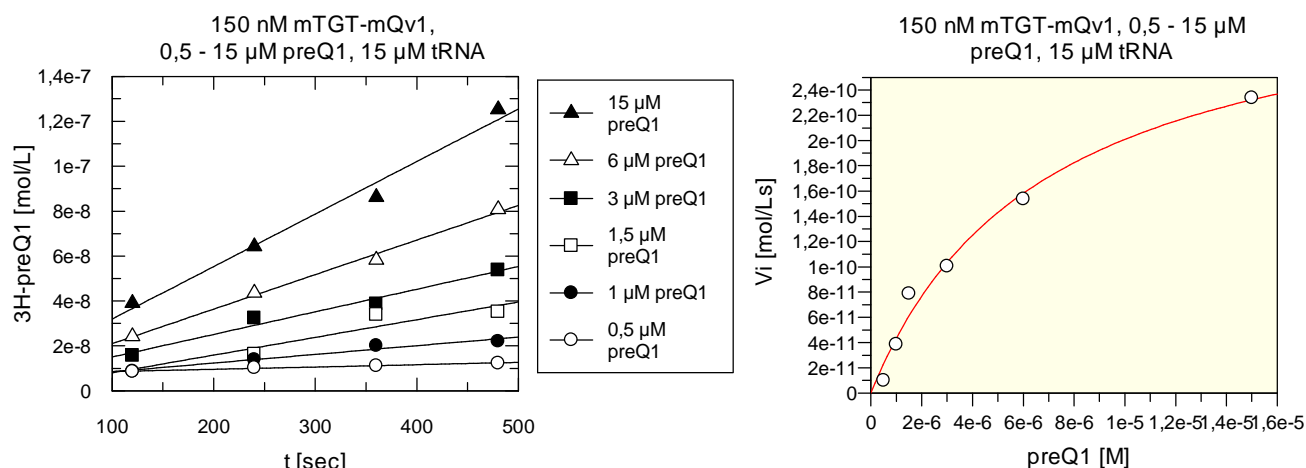
liegt der in dieser Arbeit gemessene  $K_m(\text{preQ}_1)$  für das Maus-Enzym nur geringfügig höher als der analoge  $K_m$ -Wert für Guanin. Insgesamt zeigt das Enzym jedoch eine Affinität zu  $\text{preQ}_1$ , die nahezu um eine Größenordnung niedriger ist als die zu Queuin, für das der niedrigste  $K_m$  ermittelt wurde.



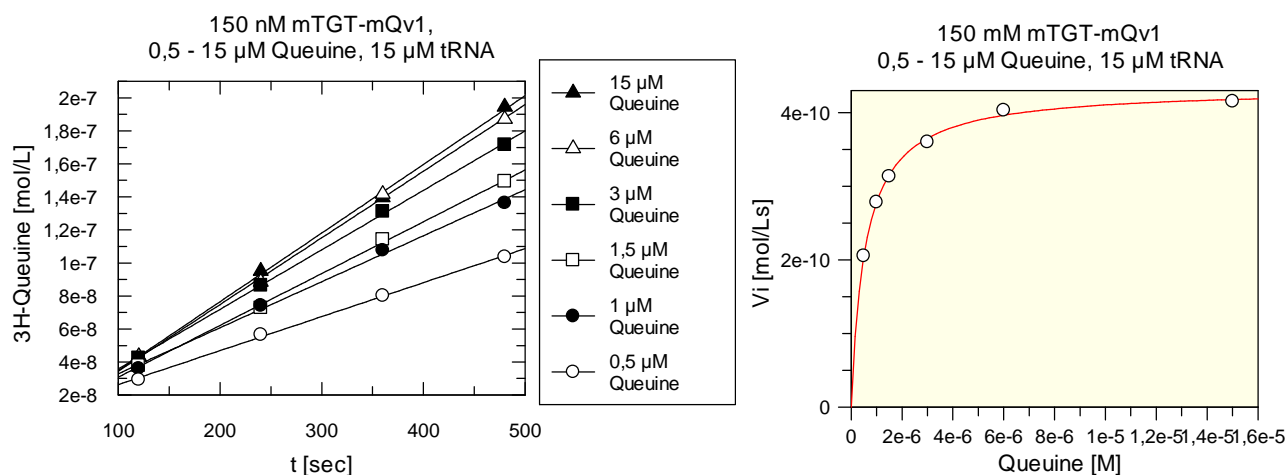
**Abbildung 66:** Links: Zeitumsatzkurven zur Ermittlung von  $v_{\max}(\text{tRNA}^{\text{Tyr}})$  und  $K_m(\text{tRNA}^{\text{Tyr}})$  des QTRT1/QTRTD1v1-Heterodimers. Aufgetragen ist die Stoffmengenkonzentration des in die  $\text{tRNA}^{\text{Tyr}}$  eingebauten  $[8\text{-}^3\text{H}]\text{-Guanin}$  gegen die Reaktionszeit in Sekunden. Rechts: Aus den ermittelten Anfangsgeschwindigkeiten resultierendes Michaelis-Menten-Diagramm.



**Abbildung 67:** Links: Zeitumsatzkurven zur Ermittlung von  $v_{\max}(\text{Guanin})$  und  $K_m(\text{Guanin})$ . Aufgetragen ist die Stoffmengenkonzentration des in die  $\text{tRNA}^{\text{Tyr}}$  eingebauten  $[8\text{-}^3\text{H}]\text{-Guanin}$  gegen die Reaktionszeit in Sekunden. Rechts: Resultierendes Michaelis-Menten-Diagramm.



**Abbildung 68:** Links: Zeitumsatzkurven zur Ermittlung von  $v_{\max}(\text{preQ}_1)$  und  $K_m(\text{preQ}_1)$ . Aufgetragen ist die Stoffmengenkonzentration des in die  $\text{tRNA}^{\text{Tyr}}$  eingebauten  $[^3\text{H}]\text{-preQ}_1$  gegen die Reaktionszeit in Sekunden. Rechts: Resultierendes Michaelis-Menten-Diagramm.



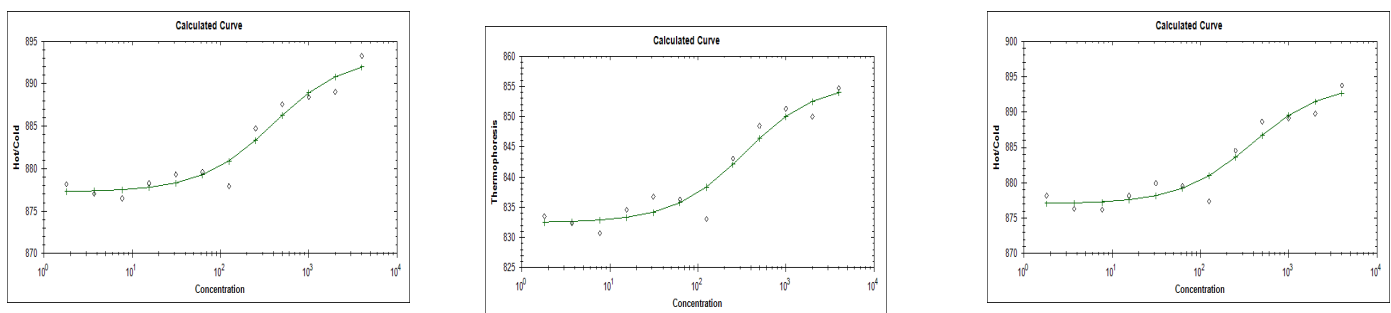
**Abbildung 69:** Links: Zeitumsatzkurven zur Ermittlung von  $v_{\max}(\text{Queuin})$  und  $K_m(\text{Queuin})$ . Aufgetragen ist die Stoffmengenkonzentration des in die  $\text{tRNA}^{\text{Tyr}}$  eingebauten  $[^3\text{H}]\text{-Queuin}$  gegen die Reaktionszeit in Sekunden. Rechts: Resultierendes Michaelis-Menten-Diagramm.

	$\text{tRNA}^{\text{Tyr}}$	$[8\text{-}^3\text{H}]\text{-Guanin}$	$[^3\text{H}]\text{-preQ}_1$	$[^3\text{H}]\text{-Queuin}$
$K_m [\mu\text{M}]$	$2,0 \pm 0,4$	$1,8 \pm 1,2$	$5,1 \pm 1,7$	$0,58 \pm 0,02$
$k_{\text{cat}} [10^{-3} \text{s}^{-1}]$	$7,5 \pm 0,2$	$4,3 \pm 1,7$	$1,7 \pm 0,6$	$3,0 \pm 0,1$
$k_{\text{cat}}/K_m [10^{-3} \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$	3,8	2,4	0,3	5,2

**Tabelle 13:** Kinetische Parameter des mQTRT1/mQTRTD1v1-Heterodimers bezüglich der Substrate  $\text{tRNA}^{\text{Tyr}}$ ,  $[8\text{-}^3\text{H}]\text{-Guanin}$ ,  $[^3\text{H}]\text{-preQ}_1$  und  $[^3\text{H}]\text{-Queuin}$ . Bei der Bestimmung der kinetischen Parameter für die  $\text{tRNA}^{\text{Tyr}}$  diente  $[8\text{-}^3\text{H}]\text{-Guanin}$  als Basensubstrat.

### 3.1.4.6 Bestimmung der Dissoziationskonstante des QTRT1/QTRTD1v1-Komplexes mittels Thermophorese

Um die Affinität der katalytischen Untereinheiten QTRT1 zur nicht-katalytischen QTRTD1v1-Untereinheit im TGT-Heterodimer zu bestimmen, wurden Thermophoresemessungen (Abschnitt 3.3.10) durchgeführt. Dabei wurde die Konzentration der mit Alexa Fluor®647 markierten QTRTD1v1-Untereinheit konstant gehalten, die der unmarkierten QTRT1-Untereinheit dagegen zwischen 4  $\mu$ M und 1,8 nM variiert. Die für den heterodimeren Komplex ermittelte  $K_d$  betrug  $360 \text{ nM} \pm 34 \text{ nM}$  (Abb 70).



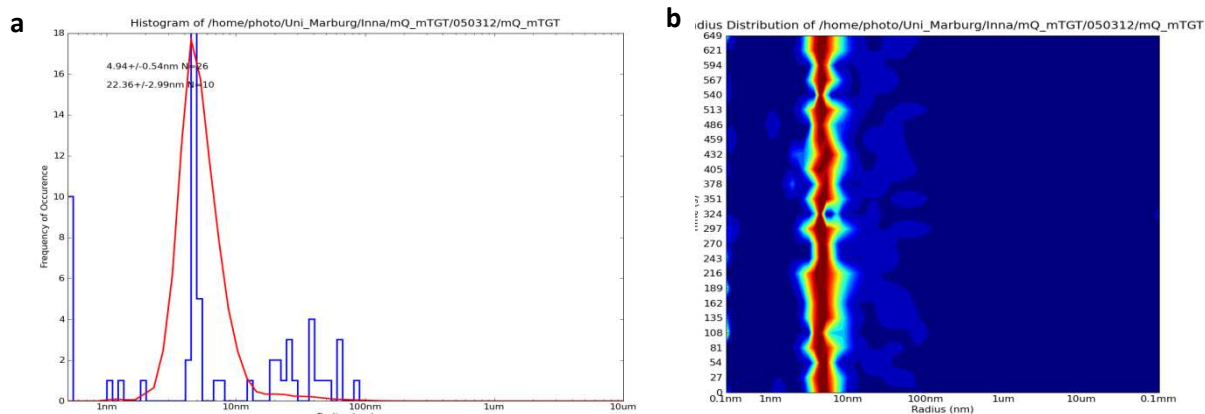
**Abbildung 70:**  $K_d$ -Bestimmung des QTRT1/QTRTD1v1-Komplexes mittels Thermophorese.

Alexa Fluor®647 markierte QTRTD1v1 in einer Konzentration von 50 nM wurde mit variierenden Konzentrationen von QTRT1 inkubiert. Die Thermophorese ist in den gezeigten Diagrammen der Dreifachbestimmung jeweils gegen die QTRT1-Konzentration aufgetragen.

### 3.1.4.7 Untersuchung der Dispersität einer mQTRT1/mQTRTD1v1-Heterodimer-Lösung mittels DLS

Eine Lösung des mQTRT1/mQTRTD1v1-Heterodimers mit einer Konzentration von 5 mg/mL wurde mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) (Abschnitt 3.3.11) auf ihre Dispersität hin untersucht. Abbildung 71a und 71b zeigen eine Histogramm- bzw. *carpet*-Darstellung der DLS-Messung dieser Lösung, nachdem sie für 5 min mit  $16000 \times g$  zentrifugiert worden war. Es ist deutlich zu erkennen, dass bereits nach 5 min Zentrifugationsdauer eine monodisperse Proteinlösung aus freiem, nicht aggregiertem Heterodimer mit einem Radius von unter 10 nm vorliegt (ein Streifen in der *carpet*-Darstellung und ein Peak in der Histogrammdarstellung).





**Abbildung 71:** Dynamische Lichtstreuung einer mQTRT1/mQTRTD1v1-Lösung nach 5 min Zentrifugation bei  $16000 \times g$ .

a: Histogrammdarstellung der Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung.

b: *carpet* - Darstellung der Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung.

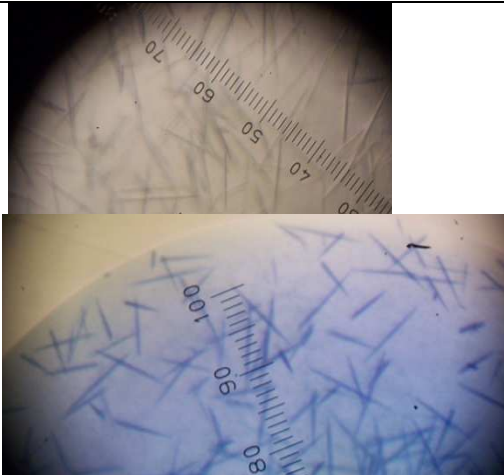
### 3.1.4.8 Kristallisationsversuche mit dem mQTRT1/mQTRTD1v1-Heterodimer



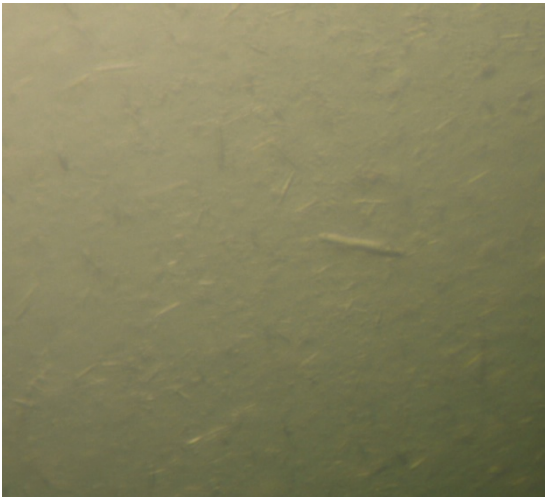
Als Voraussetzung für eine Röntgenstrukturanalyse wurde der Versuch unternommen, das mQTRT1/mQTRTD1v1-Heterodimer zu kristallisieren. Das für die Kristallisation eingesetzte Heterodimer lag in einer Konzentration von 2,5 mg/mL in 50 mM HEPES pH 7,5, 1000 mM NaCl, 2 mM DTT vor. Insgesamt wurden 2112 unterschiedliche Kristallisationsbedingungen aus den Screens der Firma Qiagen (Tabelle 14) mit der Methode der Dampfdiffusion (sitzender Topfen) getestet. Vier dieser Bedingungen führten zur Ausbildung von Kristallen bzw. kristallähnlichen Verbänden (Abb. 72). Die Bedingung Classic D 1 (4) (4% Isopropanol, 2 M Ammoniumsulfat) und die Bedingung JCSG Core II B 4 (26) (0,1 M Na HEPES, pH 7,5, 2 M Ammoniumacetat, 2 % PEG 400) führten zu einander ähnlichen nadelförmigen Kristallen, die mit *Izit crystal dye* (Hampton Research) blau angefärbt werden konnten. Leider war es nicht möglich, diese Kristalle mit einem Loop für die Datensammlung aus dem Kristallisationstropfen zu isolieren, sodass sie nicht auf ihr Diffraktionsvermögen hin getestet werden konnten. Die Bedingungen MbClass I A 2 (9) (0,1 Natriumcitrat, pH 5,6, 10 % Isopropanol) und JCSG Core II E 2 (13) (0,1 M Tris HCl, pH 8,5, 2 M Ammoniumsulfat) lieferten kristallähnliche nadelförmige Verbünde (Abb. 74). In allen vier Fällen war es nicht möglich, die Kristalle im Labormaßstab ( $V_{\text{Reservoirlösung}} = 1 \text{ mL}$ ,  $V_{\text{Kristallisationstropfen}} = 2 \mu\text{L}$ ) mit

Originallösungen der Firma Qiagen zu reproduzieren, sodass im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Optimierung dieser Bedingungen vorgenommen werden konnte.

Pipetierroboter-Screens Cartesian Microsys™ SQ 4000 / “honey bee”	Proteinkonzentration [mg/mL]	Temperatur [° C]	Bemerkung
Cryos Suite*	7	18	-Strep-tag
Classics Suite*			
Classics lite Suite*			
PACT Suite*			
JCSG+ Suite*			
JCSG Core I Suite*			
JCSG Core II Suite*			
JCSG Core III Suite*			
JCSG Core IV Suite*			
MbClass Suite*			
MbClass II Suite*			
Cryos Suite*	3	18	-Strep-tag
Classics Suite*			
Classics lite Suite*			
PACT Suite*			
JCSG+ Suite*			
JCSG Core I Suite*			
JCSG Core II Suite*			
JCSG Core III Suite*			
JCSG Core IV Suite*			
MbClass Suite*			
MbClass II Suite*			

**Tabelle 14:** Getestete Kristallisations-Screens (Qiagen) mit dem mQTRT1/ mQTRTD1v1-Heterodimer am Pipetierroboter Cartesian Microsys™ SQ 4000 / “honey bee”

Kristallbild	Bedingung	“Izit crystal dye”(Hampton Research)	Reproduktion
	Classic D 1 (4): 4% Isopropanol 2 M Ammoniumsulfat	→ positiv	→ nicht gelungen

	<u>JCSG Core II B 4 (26):</u> 0,1 M Na HEPES, pH 7,5 2 M Ammoniumacetat 2 % PEG 400	→ positiv	→ nicht gelungen
	<u>MbClass I A 2 (9):</u> 0,1 Natriumcitrat, pH 5,6 10 % Isopropanol		→ nicht gelungen
	<u>JCSG Core II E 2 (13):</u> 0,1 M Tris HCl, pH 8,5 2 M Ammoniumsulfat		→ nicht gelungen

**Abbildung 72:** Proteinkristalle des mQTRT1/ mQTRTD1v1-Heterodimers

## 3.2. Materialien

### 3.2.1 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
[8- <sup>3</sup> H]-Guanin	Hartmann Analytik
1,4-Dithiothreitol (DTT)	ROTH
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %)	ROTH
Agar-Agar	ROTH
Agarose	Fluka
Ammoniumpersulfat (APS)	ROTH
Anhydrotetrazyklin	IBA
Ampicillin	ROTH
Bromphenolblau	Merck
Chloramphenicol	ROTH
Complete mini protease inhibitor, EDTA free	Roche
Comassie Brilliant Blue R250	ROTH
Desthiobiotin	IBA
Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich
Essigsäure 100 %	ROTH
Ethanol 96 %	Riedel-deHaën
Ethyl diamintetraacetat (EDTA)	Merck
Glasperlen 2,85 – 3,3 mm	ROTH
Guanin-HCl	Merck
Glycerol p.a. 100%	Merck
<i>Hydroxy-Azophenyl-benzoesäure (HABA)</i>	IBA
Hefeextrakt	ROTH
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma Aldrich
Kanamycin	ROTH
Magnesiumchlorid	Merck
Methanol	Fischer Scientific
Natriumchlorid	ROTH
Pepton aus Casein	ROTH
[ <sup>3</sup> H]-preQ1	Hartmann Analytik
[ <sup>3</sup> H]-Queuine	Hartmann Analytik
Rotiphorese Gel 30	ROTH
Salzsäure 37 %	Riedel-deHaën
Scintillation Cocktail für lipophile Proben	ROTH
Trichloressigsäure (TCA)	Fluka
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	ROTH
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	ROTH
Tween 20	ROTH

**Tabelle 14:** Verwendete Standardchemikalien in alphabetischer Reihenfolge

Die in dieser Arbeit verwendeten Standardchemikalien sind in Tabelle 14 alphabetisch aufgelistet.

### 3.2.2 Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 15 alphabetisch aufgelistet.

Gerät	Hersteller
ÄKTA FPLC	Amersham Pharmacia Biosciences
Autoklav T-Line	Fedegari Autoclavi Spa
Feinwaage Type 404/13	Sauter
Heizrührer IKA-COMBIMAG REG	Janke & Kunkel
Grössenausschlusschromatographiesäule:	Amersham Biosciences
HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 prep grade	
Heizrührer IKA-COMBIMAG REO	Janke & Kunkel
Mikrowelle 22023/01	Siemens
PCR Mini Cyclers	MJ Research
Phenyl-Sepharose, XK16, 1,6 x 10 cm	GE Healthcare
pH-Meter 744	Metrohm
Pipetten	Eppendorf
Q-Sepharose XK26, 2,6 x 20 cm	GE Healthcare
Scanner Mustek 1200C	Mustak
Schüttelincubator Innova 4200	New Brunswick Scientific
Schüttelincubator Innova 4300	New Brunswick Scientific
Schüttel Polymax 1040	Heidolph
SDS-Gelelektrophoresekammer	Life Technologie
Semi-Micro CUVettes	Bio Rad
Spectro Size 300	Nana Biochemie Technology
Sterilbank	Köttermann
Szintillisationszähler	Packard
Thermomixer comfort 2 mL	Eppendorf
Ultraschall Sonifier 250	Branson
UV-Leuchttisch Transilluminator	BioStrep
UV-Vis-Spektrometer Smart Spec 300	BioRad
Vakuumpumpe DNA Mini	Jouan Nordic
Vortexer VF2	Janke & Kunkel
Waage Typ 404/13	Sauter
Waage Typ 572/45	Kem
Zeba 0,5 ml	Pierce
Zentrifuge Avanti J-25	Beckman Coulter
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus

**Tabelle 15:** Verwendete Geräte in alphabetischer Reihenfolge

### 3.2.3 Puffer und Lösungen

Die Einwaage kleinerer Chemikalienmengen (bis ca. 180 g) erfolgte mit einer Feinwaage vom Typ 404/13 der Firma Sauter (Genauigkeit:  $\pm 10$  mg). Beim Wägen größerer Massen (bis 3 kg) kam die Waage vom Typ 572/45 der Firma Kern zum Einsatz (Genauigkeit:  $\pm 100$  mg). Die Lösungen und Puffer wurden mit Reinstwasser aus der Entsalzungsanlage Purelab Plus (USF Elga) hergestellt. Zum Lösen wurde der Heizrührer IKA-COMBIMAG REO benutzt. Die Einstellung von pH-Werten erfolgte mit Hilfe des pH-Meters 744 der Firma Metrohm.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat
Ampicillin-Lösung (100 mg/mL)	1 g Ampicillin ad 10 mL H <sub>2</sub> O, steril filtriert
Anhydrotetracyklinlösung (2mg/mL)	4 mg Anhydrotetracyklin ad 2 mL Dimethylformamid (DMF)
Tgt-Assaypuffer (10 ×)	1 M HEPES, 200 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 7,3
Austauschpuffer I	50 mM Tris, 1 M NaCl, 2 mM DTT, pH 7,5
Austauschpuffer II	50 mM HEPES, 1 M NaCl, 2 mM DTT, pH 7,5
Chloramphenicol-Lösung (34 mg/mL)	0,34 g Chloramphenicol ad 10 mL 96 % Ethanol, steril filtriert
Coomassie-Blau Entfärbelösung	10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Methanol
Coomassie-Blue Färbelösung	10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) Methanol, 1 g Coomassie Brilliant Blau R250 ad 1000 mL H <sub>2</sub> O
Elutionspuffer I	100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM Desthiobiotin, pH 8,0
Elutionspuffer II	50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM Desthiobiotin, pH 7,0
10 mM HEPES-Lösung	0,0715 g HEPES ad 30 mL bidest. H <sub>2</sub> O, pH 7,3, steril filtriert
Hochsalzpuffer	10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 2,0 M NaCl, pH 7,8
Kanamycin-Lösung (50mg/mL)	0,5 g Kanamycin ad 10 mL bidest. H <sub>2</sub> O, steril filtriert

Laemmli-Puffer	0,25 M Tris, 2 M Glycin, 1 % (w/v) SDS, pH 8,3
Lysepuffer I	20 mM Tris, 10 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 7,8
Lysepuffer II	100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
Lysepuffer III	50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,0
1 M Magnesiumchlorid-Lösung	8,132 g $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ad 40 mL bidest. $\text{H}_2\text{O}$ , steril filtriert
SDS-Probenpuffer (4 ×)	250 mM Tris, 8 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) Glycerol, 0,04 % (w/v) Bromphenolblau, 8 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol, in $\text{H}_2\text{O}$ pH 6,8
Trichloressigsäure (TCA) 5%	TCA 5 % (w/v)
Trichloressigsäure (TCA) 10%	TCA 10 % (w/v)
TGT-Assaypuffer	100 mM HEPES, 20 mM $\text{MgCl}_2$ , 323 $\mu\text{M}$ Tween 20, pH 7,3
Trenngelpuffer	1 M Tris pH 8,8
Regenerationspuffer	100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM HABA, pH 8,0

**Tabelle 16:** Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen

### 3.2.4 Medien

Für die Anzucht von Bakterienkulturen wurden das 2 × TY-Medium und das LB-Medium verwendet. Vor Gebrauch wurden die Medien autoklaviert (30 min, 121 °C, 1,3 bar) und nach dem Abkühlen mit den entsprechenden Antibiotika-Lösungen versetzt. Zur Herstellung von festen Nährböden (Agarplatten) wurde dem Medium 1,5 % (w/v) Agar zugegeben. Die Zusammensetzung der Medien ist in Tabelle 17 aufgelistet.

Medium	Zusammensetzung
2 × TY-Medium	1,8 % (w/v) Pepton aus Casein 1 % (w/v) Hefe 0,5 % (w/v) NaCl pH 7,0, autoklaviert
2 × TY-Agar	1,8 % (w/v) Pepton aus Casein 1 % (w/v) Hefe 0,5 % (w/v) NaCl

LB-Medium	1,5 % (w/v) Agar-Agar pH 7,0, autoklaviert
LB-Agar	1,0 % (w/v) Pepton aus Casein 0,5 % (w/v) Hefe 0,5 % (w/v) NaCl pH 7,0, autoklaviert
	1,0 % (w/v) Pepton aus Casein 0,5 % (w/v) Hefe 0,5 % (w/v) NaCl 1,5 % (w/v) Agar-Agar pH 7,0, autoklaviert

**Tabelle 17:** Zusammensetzung verwendeter Medien

### 3.2.5 Bakterienstämme

Für Klonierungszwecke und Genexpression wurden verschiedene *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämme verwendet. In Tabelle 18 sind diese Stämme mit Genotyp und Vertreter aufgelistet.

Stamm	Genotyp / Beschreibung	Vertreiber
XL2-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac</i> <sup>q</sup> <i>ZΔM15 Tn10</i> (Tet <sup>r</sup> ) Amy Cam <sup>r</sup> ]	Stratagene
BL21 Gold (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS</i> ( <i>r<sub>B</sub>m<sub>B</sub></i> ) <i>dcm</i> <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> <i>gal λ</i> (DE3) <i>endA Hte</i>	Stratagene
BL21 CodonPlus(DE3)-RIL	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS</i> ( <i>r<sub>B</sub>m<sub>B</sub></i> ) <i>dcm</i> <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> <i>gal λ</i> (DE3) <i>endA Hte</i> [ <i>argU ileY leuW</i> Cam <sup>r</sup> ]	Stratagene
BL21 (DE3)pLysS	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS</i> ( <i>r<sub>B</sub>m<sub>B</sub></i> ) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam <sup>r</sup> )	Novagen
BL21 Rosetta 2(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS</i> ( <i>r<sub>B</sub>m<sub>B</sub></i> ) <i>gal dcm</i> (DE3) pRARE2 (Cam <sup>r</sup> )	Novagen

**Tabelle 18:** In dieser Arbeit verwendete *E. coli*- Stämme mit Genotyp und Vertreter



### 3.2.6 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 19 aufgeführt.

Plasmid	Genotyp / Beschreibung	Herkunft
pASK-IBA13plus_mTGT	Amp <sup>r</sup> , ColEI-origin, f1 origin, Tet-Repressor, enthält <i>mQTRT1</i> als 1246 bp <i>BsaI</i> / <i>BsaI</i> Fragment in pASK-IBA13plus	Geneart
pASK-IBA13plus_mQv1	Amp <sup>r</sup> , ColEI-origin, f1 origin, T7-Promotor, enthält <i>mQTRTD1v1</i> als 1284 bp <i>BsaI</i> / <i>BsaI</i> Fragment in pASK-IBA13plus	Geneart
pASK-IBA13plus_hTGT	Amp <sup>r</sup> , ColEI-origin, f1 origin, Tet-Repressor, enthält <i>hQTRT1</i> als 1212 bp <i>BsaI</i> / <i>BsaI</i> Fragment in pASK-IBA13plus	Geneart
pASK-IBA13plus_hQ	Amp <sup>r</sup> , ColEI-origin, f1 origin, Tet-Repressor, enthält <i>hQTRTD1</i> als 1248 bp <i>BsaI</i> / <i>BsaI</i> Fragment in pASK-IBA13plus	Geneart

**Tabelle 19:** Übersicht der verwendeten Plasmide mit Genotyp und Herkunft

## 3.3. Methoden

### 3.3.1 Klonierungstechniken

Die verwendeten Lösungen, Reaktionsgefäße und Glasgeräte wurden, wenn möglich, vor Gebrauch autoklaviert (30 min, 121 °C, 1,3 bar). Um eventuell vorhandene Nukleasen zu inaktivieren, wurden die Arbeitsflächen und Gebrauchsmaterialien unter Verwendung von 80 % (v/v) Ethanol sterilisiert.

#### 3.3.1.1 Transformation

Für die Transformation wurden 50 µL kommerziell erworbene kompetente *E. coli*-Zellen (Abschnitt 3.2.5) mit 100 bis 200 ng des zu transformierenden Plasmids versetzt und für 30

min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 42 s bei 42 °C in einem Heizblock einem Hitzeschock ausgesetzt und danach für 10 min auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden dann mit LB-Medium auf 1 mL aufgefüllt und für weitere 45 min bei 37 °C in einem Thermomixer inkubiert. Nach Zentrifugation der Zellen bei 13000 rpm für 2 min wurden anschließend 900 µL des Überstandes verworfen. Das Zellpellett wurde in dem verbliebenen 100 µL-Überstand resuspendiert und unter der Sterilbank auf Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika zur Selektion ausplattiert. Die Agarplatten wurden anschließend in einem Brutschrank für mindestens 16 h bei 37 °C inkubiert. Bei erfolgreicher Transformation wuchsen Einzelkolonien heran. Von jeweils einer einzelnen Kolonie wurde eine Mutterkultur angesetzt, die anschließend für die Herstellung von Glycerinstocks, zur Sequenzierung des modifizierten Plasmids oder für die Vorkultur der rekombinanten Proteinproduktion verwendet wurde.

### **3.3.1.2 Plasmidpräparation**

Die Plasmidpräparation zum Zweck der Sequenzierung erfolgte mit dem peqGold Plasmid Miniprep Kit I (C-Line, peQ-Lab) nach dem beigefügten Protokoll des Herstellers.

### **3.3.1.3 DNA-Sequenzierung**

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma MWG (MWG Biotech AG, Ebersberg) mit jeweils 1,5 µg zur Trockenheit eingeengter Plasmid-DNA durchgeführt.

### **3.3.1.4 Glycerinstocks**

Nachdem der Erfolg einer Plasmid-Klonierung durch Sequenzanalyse überprüft worden war, wurde jeweils eine Einzelkolonie mit dem entsprechenden Plasmid in 10 mL Medium mit Antibiotikum überführt und über Nacht in einem Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 700 µL der Kultur mit 300 µL sterilem Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bei -80 °C gelagert und katalogisiert.

### **3.3.2 Rekombinante Produktion und Aufreinigung der Queuin-tRNA-Ribosyltransferase 1 aus dem Menschen (hQTRT1) und der Maus (mQTRT1)**

Die Überproduktion und Aufreinigung der QTRT1 aus dem Menschen und der Maus wurden im Rahmen dieser Arbeit etabliert.

#### **3.3.2.1 Rekombinante Produktion der hQTRT1 und mQTRT1 in *E. coli***

Für die Vor- und Hauptkulturen wurde steril autoklaviertes 2 × TY Medium verwendet. Nach dem Abkühlen wurde für die Vorkultur 100 mL 2 × TY Medium in einem 500 mL-Kolben und für die Hauptkultur 2 L 2 × TY Medium in jeweils 5 L-Kolben mit frisch hergestellter ethanolischer Chloramphenicol-Lösung (34 mg/mL) und wässriger Ampicillin-Lösung (100 mg/mL) im Verhältnis 1:1000 versetzt. Danach wurde die Vorkultur unter einer Sterilbank mit dem entsprechenden *E. coli*-Stamm, der mit dem benötigten Expressionsplasmid transformiert war (s. Abschnitt 3.2.6), beimpft. Nach dem Animpfen wurde die Vorkultur bei 37 °C für etwa 16 h im Schüttelinkubator bei 220 rpm herangezogen. Nach Verdünnung der Vorkultur (1:80) wurde die Hauptkultur in einem Schüttelinkubator bei 220 rpm für mehrere Stunden bei 37 °C inkubiert. Während der Inkubation wurde in regelmäßigen Zeitabständen jeweils 1 mL aus der Hauptkultur entnommen, um mittels UV-Vis-Spektrometrie die OD<sub>600</sub> Absorption zu bestimmen. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 0,8 wurden 200 µL einer Anhydrotetracyclin-Lösung (0,2 mg/mL) zur Kultur gegeben, wodurch die Expression des Zielgens induziert wurde. Des Weiteren wurde die Temperatur von 37 °C auf 15 °C herabgesetzt, um ein langsames Wachstum der Bakterien und eine langsamere Produktion des Proteins zu ermöglichen. Nach weiteren 16 bis 18 h bei 15 °C wurden die Zellen durch Zentrifugation (Beckman Coulter, JA-10) bei 10000 rpm und 4 °C für 10 min geerntet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

#### **3.3.2.2 Zellyse und Herstellung eines hQTRT1- bzw. mQTRT1-haltigen Rohextrakts**

Nach erfolgter Überexpression (Abschnitt 3.3.2.1) wurde das Zellpellet in Lysepuffer II resuspendiert. Das Aufschließen der Bakterienzellen erfolgte mit Hilfe eines Ultraschallgeräts (Sonifier 250, fünfmal 2 min, Einstellung: duty cycle 80 %, output control 3-4). Dabei wurde

die Zellsuspension auf Eis gehalten. Das Abtrennen der unlöslichen Zellbestandteile von löslichen Bestandteilen erfolgte mittels Zentrifugation (Beckman Coulter, JA-25.0) bei 20000 rpm und 4 °C für 60 min. Der klare Überstand, in dem das Zielprotein vorlag, wurde dekantiert und für die nachstehende Reinigung mittels Säulenchromatographie weiterverwendet.

### **3.3.2.3      Aufreinigung der rekombinanten hQTRT1 bzw. mQTRT1 mittels Säulenchromatographie**

Die Reinigung der eukaryotischen hTGT und mTGT erfolgte mittels Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie an einer ÄKTA-FPLC-Anlage und anschließender Abtrennung des *Strep*-tag® II. Das klare Zelllysate aus Abschnitt 3.3.2.2 wurde zunächst mit einer Flussrate von 2 mL/min auf eine mit Lysepuffer II konditionierte *Strep*-Tactin® Säule aufgetragen. Nach Waschen mit dem fünffachen Säulenvolumen mit Lysepuffer II bis zur konstanten Basislinie erfolgte, ebenfalls bei einer Flussrate von 2 mL/min, die Elution der hQTRT1/mQTRT1 mit Elutionspuffer I. Die hQTRT1/mQTRT1-haltigen Fraktionen wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Abschnitt 3.3.4) identifiziert, vereinigt und mit Hilfe von Vivaspin 20 mL-Konzentratoren ("Cutoff": 30 kDa; Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) in einer Multifuge 3SR (Heraeus) bei 3000 rpm auf ein Volumen von etwa 5 bis 3 mL ankonzentriert. Das Konzentrat wurde anschließend auf eine mit Austauschpuffer I konditionierte HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 prep grade Chromatographiesäule aufgetragen und mit einer Flussgeschwindigkeit von 2 mL/min mit Austauschpuffer I eluiert. Die gesammelten Fraktionen wurden im Anschluss durch SDS-PAGE analysiert. Alle Fraktionen, die offensichtlich reines Zielprotein enthielten, wurden vereinigt und wie oben beschrieben auf die gewünschte Proteinkonzentration ankonzentriert. Vor der Entfernung des *Strep*-tag® II erfolgte die Überprüfung der Reinheit der konzentrierten Proteinprobe mittels Massenspektrometrie.

### **3.3.2.4      Entfernung des *Strep*-tag® II vom Zielprotein durch Thrombin**

Die Entfernung des *Strep*-tag® II erfolgte mit Hilfe des Thrombin Cleavage Capture Kit der Firma Novagen nach dem beigefügten Protokoll. Das Proteinkonzentrat wurde hierbei mit einem 10-fachen Thrombin-Cleavage-Puffer und biotinyliertem Thrombin in einer

Konzentration von 1 U/mg Protein versetzt und für 16 h bei 20 °C inkubiert. Die Entfernung des abgeschnitten Tags und des biotinylierten Thrombins erfolgte durch Inkubation mit einer 50 % Streptavidinsuspension für 30 min bei 20 °C. Dabei binden 32 µL einer 50 % Streptavidinsuspension 1 U biotinyliertes Thrombin. Der Reaktionsansatz wurde anschließend in einem 1,5 mL Eppendorf-Tube auf eine Filtersäule gegeben und durch Zentrifugation vom Streptavidin getrennt. Die erfolgreiche Entfernung des *Strep*-tags wurde ebenfalls durch Massenspektrometrie überprüft.

### **3.3.3 Rekombinante Produktion und Aufreinigung der Queuin-tRNA-Ribosyltransferase mit einer Protein-1 Domäne (QTRTD1) aus dem Mensch und der Maus (Isoform 1)**

Auch die Überproduktion und Aufreinigung der QTRTD1 aus dem Menschen und der Maus wurden im Rahmen dieser Arbeit etabliert.

#### **3.3.3.1 Rekombinante Produktion der hQTRTD1 und mQTRTD1 in *E. coli***

Die rekombinante Produktion der QTRTD1 aus Mensch und Maus erfolgte völlig analog zu der der QTRT1 (s. 3.3.2.1).

#### **3.3.3.2 Zelllyse und Herstellung eines hQTRTD1- bzw. mQTRTD1-haltigen Rohextrakts**

Die Zelllyse und Herstellung des Rohextrakts erfolgte völlig analog wie bei der Präparation rekombinanter QTRT1 (s. Abschnitt 3.3.2.2).

#### **3.3.3.3 Aufreinigung der rekombinanten hQTRTD1 bzw. mQTRTD1 mittels Säulenchromatographie**

Die Reinigung der QTRTD1 und QTRTD1 aus Maus bzw. Mensch erfolgte durch Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie an einer ÄKTA FPLC-Anlage und anschließende Abtrennung des *Strep*-tag® II. Das klare Zelllysats aus Abschnitt 3.3.3.2 wurde auf eine mit Lysepuffer III konditionierte *Strep*-Tactin® II-Säule mit einer Flussrate von 2 mL/min aufgetragen. Nach Waschen mit dem fünffachen Säulenvolumen mit

Lysepuffer III bis zur konstanten Basislinie erfolgte die Elution des Zielproteins mit Elutionspuffer II bei einer Flussrate von 2 mL/min. Die QTRTD1-haltigen Fraktionen wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Abschnitt 3.3.4) identifiziert, vereinigt und mit Hilfe von Vivaspin 20 mL-Konzentratoren ("Cutoff": 30 kDa; Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) in einer Multifuge 3SR (Heraeus) bei 3000 rpm auf ein Volumen von etwa 5 bis 3 mL ankonzentriert. Das Konzentrat wurde anschließend auf eine mit Austauschpuffer II konditionierte HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 prep grade Chromatographiesäule aufgetragen und mit einer Flussgeschwindigkeit von 2 mL/min mit Austauschpuffer II eluiert. Die gesammelten Fraktionen wurden im Anschluss mittels SDS-PAGE analysiert. Alle Fraktionen, die offensichtlich reines Zielprotein enthielten, wurden vereinigt und auf die gewünschte Proteinkonzentration ankonzentriert. Vor der Entfernung des *Strep*-tag® II erfolgte auch hier die Überprüfung der Reinheit der konzentrierten Proteinprobe mittels Massenspektrometrie.

### **3.3.3.4 Entfernung des *Strep*-tag® II durch Thrombin**

Die Entfernung des *Strep*-tags vom Zielprotein erfolgte wie in Abschnitt 3.3.2.4 beschrieben.

### **3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Der Erfolg der Proteinexpression sowie der Fortschritt der Proteinreinigung wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft. Zunächst wurden je 20 µL der Probelösungen mit 20 µL 4 × SDS-Probenpuffer versetzt und danach für 5 min bei 95 °C im Thermomixer erhitzt. Suspensionen, die aus unlöslichen Fraktionen von Zellaufschlüssen stammten, wurden für mindestens 15 min bei 95 °C erhitzt. Das Polyacrylamidgel, das aus einem Sammelgel (Zusammensetzung siehe Tabelle 20) und einem Trenngel (Zusammensetzung siehe Tabelle 21) bestand, wurde senkrecht in eine mit Laemmli-Puffer gefüllte Kammer gestellt. Anschließend wurden 15 µL der jeweiligen vorbehandelten Probe und zusätzlich ein Größenmarker in die Taschen des Polyacrylamidgels pipettiert. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 120 V für ungefähr 2 h. Nach dem Auftrennen der Proteine wurde das Sammelgel von dem Trenngel abgetrennt. Das Trenngel wurde dann über Nacht mit Coomassie-Blau-Färbelösung angefärbt. Anschließend wurde es mit einer Coomassie-Blau-Entfärbelösung in der Mikrowelle zwischen 90 und 180 W für 5 min entfärbt. Die

gefärbten Proteinbanden blieben dabei erhalten, sodass das Bandenmuster mit einer Kamera fotografiert und dokumentiert werden konnte.

Komponente	Volumen
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %)	0,50 mL
H <sub>2</sub> O	1,87 mL
Sammelgelpuffer	0,60 mL
10 % SDS-Lösung	30 µL
APS	30 µL
TEMED	3,0 µL

**Tabelle 20:** Zusammensetzung des Sammelgels

Komponente	Volumen
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %/0,8 %)	1,50 mL
H <sub>2</sub> O	0,47 mL
Trenngelpuffer	1,00 mL
10 % SDS-Lösung	30 µL
APS	30 µL
TEMED	3,0 µL

**Tabelle 21:** Zusammensetzung des Trenngels

### 3.3.5 Konzentrationsbestimmung von DNA-, *E. coli*-tRNA<sup>Tyr</sup>- und Proteinlösungen

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch. Die Absorption von Proteinlösungen wurde bei 280 nm, die Absorption von DNA- und tRNA-Lösungen bei 260 nm bestimmt. Für den Nullabgleich wurde das jeweilige Lösungsmittel verwendet.

#### 3.3.5.1 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Die DNA-Konzentration wurde nach der folgenden Formel für doppelsträngige DNA berechnet.

$$\mu\text{g DNA/mL} = A_{260} \times 50 \mu\text{g/mL} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  wird als Maß für die Reinheit der Probe herangezogen. Bei einem Wert von 1,8 bis 2,0 beträgt die Reinheit der DNA-Probe 70-95 % [Sambrook et al., 1989].

### 3.3.5.2 Konzentrationsbestimmung von *E. coli*-tRNA<sup>Tyr</sup>-Lösungen

Die Konzentration von *E. coli* tRNA<sup>Tyr</sup>-Lösungen wurde nach folgendem Zusammenhang ermittelt [Curnow et al., 1993]:

$$1 \mu\text{M tRNA}^{\text{Tyr}} \equiv 0,703 A_{260}$$

Der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  gilt als Maß für die Reinheit der Probe. Bei einem Wert von 1,8 bis 2,0 beträgt die Reinheit der tRNA<sup>Tyr</sup>-Probe > 90 % [Sambrook et al., 1989].

### 3.3.5.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Für die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen wurde zunächst der Extinktionskoeffizient des jeweiligen Proteins (Tabelle 22) mit Hilfe des Programms ProtParam [Internetseite <http://www.expasy.org/tool/protparam.htm>] berechnet. Ist der Extinktionskoeffizient bekannt, lässt sich die Konzentration nach dem Lambert-Beer-Gesetz berechnen [Nelson & Cox, 2001]:

$$A_{280} = c \cdot \epsilon \cdot d$$

$A_{280}$  = bei 280 nm gemessene Absorption

$c$  = Konzentration der Proteinlösung [mg/mL]

$\epsilon$  = spezifischer Absorptionskoeffizient [mL/mg·cm]

$d$  = Schichtdicke der Küvette [cm]

1 mg/mL <i>Mus musculus</i> TGT ( <b>mit</b> Strep-tag® II)	=	0,868 $A_{280}$
1 mg/mL <i>Mus musculus</i> TGT ( <b>ohne</b> Strep-tag® II)	=	0,784 $A_{280}$
1 mg/mL <i>Mus musculus</i> Qv1 ( <b>mit</b> Strep-tag® II)	=	0,631 $A_{280}$
1 mg/mL <i>Mus musculus</i> Qv1 ( <b>ohne</b> Strep-tag® II)	=	0,541 $A_{280}$
1 mg/mL <i>Homo sapiens</i> TGT ( <b>mit</b> Strep-tag® II)	=	0,956 $A_{280}$
1 mg/mL <i>Homo sapiens</i> TGT ( <b>ohne</b> Strep-tag® II)	=	0,858 $A_{280}$
1 mg/mL <i>Homo sapiens</i> Q ( <b>mit</b> Strep-tag® II)	=	0,691 $A_{280}$
1 mg/mL <i>Homo sapiens</i> Q ( <b>ohne</b> Strep-tag® II)	=	0,603 $A_{280}$

**Tabelle 22:** Mit dem Programm ProtParam berechnete Extinktionskoeffizienten der Proteine mTGT, mQv1, hTGT und hQ.



### 3.3.6 Präparation und Reinigung des Plasmids ptRNA2

Das Plasmid ptRNA2 codiert die *E.coli* tRNA<sup>Tyr</sup>. Für die Präparation des Plasmids wurde zunächst 2 L Ampicillin haltiges LB-Medium mit *E. coli* ptRNA2 in XL2-blue Zellen angeimpft und bei 37 °C für 19 Stunden bei 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (Beckman Coulter, JA-10) bei 10000 rpm und 4 °C für 10 min geerntet. Das Plasmid wurde mittels eines peqGold Plasmid Miniprep Kit I (C-Line, peQ-Lab) nach dem beigefügten Protokoll aus den geernteten *E. coli* Zellen isoliert. Danach erfolgte über Nacht bei 60 °C der Restriktionsverdau des extrahierten Plasmids mit Hilfe des Restriktionsenzym *Bst*NI. Dabei wurde ein DNA-Fragment erhalten, das eine Bindestelle für die T7-RNA-Polymerase sowie die Sequenz (Abb. 73), welche für die tRNA<sup>Tyr</sup> kodiert, enthält. Für die Isolierung des DNA-Fragments wurde anschließend der Ansatz nach dem Restriktionsverdau mit dem gleichen Volumen einer Mischung aus Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 versetzt. Das DNA-Fragment wurde in die wässrige Phase ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde verworfen. Die wässrige Phase wurde erneut mit dem gleichen Volumen einer Mischung aus Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 24:1 versetzt. Die organische Phase wurde erneut verworfen. Die wässrige Phase wurde schließlich auf eine mit ddH<sub>2</sub>O (steril) äquilibrierte NAP<sup>TM</sup>-25 Säule aufgetragen und mit 3,5 mL ddH<sub>2</sub>O (steril) eluiert. Das Eluat wurde unter Vakuum trockenrotiert und mit Nuklease-freiem Wasser zu einer Konzentration von 1 mg/mL gelöst.

GGU GGG GUU CCC GAG CGG CCA AAG GGA GCA GAC UGU AAA UCU GCC GUC AUC GAC UUC GAA  
GGU UCG AAU CCU UCC CCC ACC ACC A

Molekulargewicht: 27351,5 Da

$\epsilon(260 \text{ nm}) = 33.3 \text{ mL/mg}\cdot\text{cm}$  (Wasser)

**Abbildung 73:** tRNA<sup>Tyr</sup>-Sequenz, Molekulargewicht und Extinktionskoeffizient

### 3.3.7 Präparation und Reinigung nicht modifizierter *E.coli*-tRNA<sup>Tyr</sup>

Die Herstellung von nicht modifizierter *E. coli*-tRNA<sup>Tyr</sup> durch *in vitro* Transkription und die Reinigung wurde nach dem Protokoll von Curnow et al. (1993) und gemäß des Herstellerprotokolls des verwendeten T7 RiboMAX<sup>TM</sup> Express Large Scale RNA Production System von Promega durchgeführt.

### 3.3.8 Bestimmung von kinetischen Parametern der QTRT1 und QTRTD1 (Enzymassay)

Die Bestimmung kinetischer Parameter der TRTD1 und QTRTD1 bezüglich der

unterschiedlichen Substrate erfolgte wie bei Meyer et al. (2006) beschrieben. Dabei basiert der Enzymassay auf der Enzymfunktion der TGT, die das Guanin 34 in dem Antikodon-Loop der tRNA gegen ein freies natürliches Substrat (Guanin, preQ<sub>1</sub>, Queuin) aus dem Reaktionsansatz austauscht. Enthält der Reaktionsansatz Tritium-markiertes Guanin ([8-<sup>3</sup>H]-Guanin), preQ<sub>1</sub> ([<sup>3</sup>H]-preQ<sub>1</sub>) oder Queuin ([<sup>3</sup>H]-Queuin), wird die tRNA durch den Basenaustausch radioaktiv markiert. Die kinetischen Parameter können dann aus der Zunahme der Radioaktivität der tRNA<sup>Tyr</sup> gegen die Zeit bestimmt werden. Im Fall der QTRT1 und QTRTD1v1 aus der Maus und dem Menschen wurden die Messungen bei einer Proteinkonzentration von jeweils 150 nM durchgeführt. Die Bestimmung der kinetischen Parameter bezüglich der tRNA<sup>Tyr</sup> wurde mit 10 µM einer 15 %igen radioaktiv markierten Guaninlösung und aufsteigender tRNA<sup>Tyr</sup> Konzentration von 0,5 bis 15 µM durchgeführt. Für die Bestimmung der kinetischen Parameter bezüglich Guanin wurden 15 µM tRNA<sup>Tyr</sup> und aufsteigende Guaninkonzentrationen von 0,5 bis 15 µM einer 15 %igen radioaktiv markierten Guaninlösung verwendet. Für die Bestimmung der kinetischen Parameter bezüglich preQ<sub>1</sub> wurden 15 µM tRNA<sup>Tyr</sup> und aufsteigende Konzentrationen einer 10 %igen preQ<sub>1</sub>/[<sup>3</sup>H]preQ<sub>1</sub> Mischung verwendet. Für die Bestimmung der kinetischen Parameter bezüglich Queuin wurden 15 µM tRNA<sup>Tyr</sup> und aufsteigende Konzentrationen von 0,5 µM bis 15 µM einer [<sup>3</sup>H]Queuinlösung verwendet. Der Reaktionsansatz (38 µL) bestand aus dem Assaypuffer, 0,037 % (v/v) Tween 20, der zur untersuchenden Base und 15 µM tRNA<sup>Tyr</sup> bzw. 10 µM einer 15 %igen radioaktiv markierten Guaninlösung. Die Starterlösung (38 µL) bestand aus dem Assaypuffer, 0,037 % (v/v) Tween 20 und der jeweiligen QTRT1 (150 nM) oder QTRTD1 (150 nM). Beide Ansätze wurden zunächst für 10 min bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe der Starterlösung (38 µL) zum Reaktionsansatz (38 µL) wurde die Enzymreaktion gestartet. In einem Zeitintervall von 2 min wurden 15 µL-Aliquots aus dem Reaktionsansatz entnommen und auf GF/C-Glasfilterplättchen (Whatman) pipettiert. Zur vollständigen Fällung der tRNA<sup>Tyr</sup> und um die Enzymreaktion zu stoppen, wurden die Filterplättchen sofort in eine eiskalte 10 %ige (w/v) Trichloressigsäurelösung (TCA) gebracht und darin für 20 min gewaschen. Nach weiterem zweimaligen Waschen in 5 %iger (w/v) TCA-Lösung wurden die Plättchen in Ethanol gewaschen und schließlich für 45 min bei 60 °C getrocknet. Jede Probe wurde nach dem Trocknen mit 4 mL *Scintillationscocktail* (Roth) für lipophile Proben luftblasenfrei beschichtet und der Anteil an eingebauter radioaktiv markierter Base in der tRNA<sup>Tyr</sup> gemessen. Für die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  und der max.

Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{max}$  wurde zunächst die Anfangsgeschwindigkeit  $v_0$  aus der Steigung der Regressionsgeraden bei der Auftragung der Stoffmengenkonzentration an eingebauter radioaktiv markierter Base in die tRNA<sup>Tyr</sup> gegen die Reaktionszeit in Sekunden ermittelt. Die Stoffmengenkonzentration an eingebauter radioaktiv markierter Base ergab sich dabei aus der experimentell ermittelten Zählrate der Radioaktivität [cpm], der spezifischen Aktivität der radioaktiv markierten Base [Ci/mol], der Detektorintensität (vorab durch Kalibrierung des Detektors ermittelt) und dem Entnahmevolumen [μL] der Proben. Zusätzlich wurde der Umrechnungsfaktor von Curie [Ci] in die theoretische Zählrate der Radioaktivität benutzt ( $1\mu\text{Ci}=2\,220\,000\text{ cpm}$ ). Dann wurden die ermittelten Anfangsgeschwindigkeiten  $v_0$  gegen die jeweilige Substratkonzentration aufgetragen. Mit Hilfe des Programms GraFit 4 [Leatherbarrow, 1999] und einer nicht linearen Kurvenanpassung an die Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 1) wurde ein Michaelis-Menten-Diagramm erstellt. Aus dem Kurvenverlauf des Michaelis-Menten-Diagramms wurden schließlich die Michaelis-Konstante  $K_m$  und die maximale Geschwindigkeit der Enzymreaktion  $v_{max}$  ermittelt. Die Michaelis-Konstante  $K_m$  gibt die Substratkonzentration an, bei der die Umsatzgeschwindigkeit halbmaximal ist ( $v = \frac{1}{2} \cdot v_{max}$ ), die also bei Halbsättigung vorliegt. Desweiteren ist  $K_m$  eine enzyspezifische Konstante, die von dem Substrat, der Temperatur und dem pH-Wert abhängt.

$$v_0 = \frac{v_{max} \cdot c(S)}{K_m + c(S)} \quad (1)$$

### 3.3.9 Bestimmung von Inhibitionskonstanten

Die Bestimmung der Inhibitionskonstanten ( $K_i$ -Werte) wurde nach dem Protokoll von Stengl et al. (2005) durchgeführt. Auch das Prinzip von dieser Messmethode basiert auf der Enzymfunktion der TGT und ist im Ablauf mit dem im Abschnitt 3.3.8 beschriebenen Assay zur Bestimmung von kinetischen Parametern identisch. Zur Bestimmung der Selektivität von Inhibitoren wurde die Messungen bei einer Konzentration des eukaryotischen Heterodimers mQTRT1/mQTRTD1v1 von 150 nM durchgeführt. Alle Inhibitoren wurden auf Grund ihrer schlechten Wasserlöslichkeit zunächst in DMSO gelöst. Der finale DMSO-Anteil betrug maximal 5 %. Bei diesem Anteil hat DMSO keinen Einfluss auf die Enzymaktivität. Zunächst wurde sowohl der 38 μL-Reaktionsansatz, bestehend aus dem Assaypuffer, 0,037 % (v/v) Tween 20, 1,5 μM tRNA<sup>Tyr</sup> und 10 μM einer 15 %igen radioaktiv markierten Guaninlösung,

wie auch die 38 µL-Starterlösung, bestehend aus dem Assaypuffer, 0,037 % (v/v) Tween 20, dem Inhibitor in der jeweiligen Konzentration und dem Heterodimer (mQTRT1/mQTRTD1v1) für 10 min bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe der 38 µL Starterlösung zum 38 µL-Reaktionsansatz wurde die Enzymreaktion gestartet. In einem Zeitintervall von 2 min wurden 15 µL-Aliquots aus dem Reaktionsansatz entnommen und auf GF/C-Glasfilterplättchen (Whatman) pipettiert. Zur vollständigen Fällung der tRNA<sup>Tyr</sup> und für das Beenden der Enzymreaktion wurden die Filterplättchen sofort in eine eiskalte 10 %ige (w/v) Trichloressigsäurelösung (TCA) gebracht und darin für 20 min gewaschen. Nach weiterem zweimaligen Waschen in 5 %iger (w/v) TCA-Lösung wurden die Plättchen in Ethanol gewaschen und schließlich für 45 min bei 60 °C getrocknet. Jede Probe wurde nach dem Trocknen mit 4 mL *Scintillationscocktail* für lipophile Proben luftblasenfrei beschichtet und der Anteil an eingebauten radioaktiv markierten Basen in der tRNA<sup>Tyr</sup> gemessen. Zunächst wurden, wie bereits im Abschnitt 3.3.8 beschrieben, die Anfangsgeschwindigkeiten  $v_i$  aus der Steigung der Regressionsgeraden ermittelt. Die Bestimmung der Inhibitionskonstanten ( $K_i$ -Wert) eines kompetitiven Inhibitors erfolgte nach der Methode von Dixon [Dixon, 1965]. Danach ist die Anfangsgeschwindigkeit  $v_i$  [µM/min] der Enzymreaktion bei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen gegeben als (Gleichung 2)

$$v_i = \frac{v_{\max} \cdot c(S)}{K_m \cdot \left(1 + \frac{c(I)}{K_i}\right) + c(S)} \quad (2)$$

Da die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $v_{\max}$  schwer reproduzierbar ist, wurde  $V_{\max}$  für jede Messung neu bestimmt. Die Inhibitionskonstante lässt sich aus dem Verhältnis  $v_0/v_1$  bestimmen, dazu wurden die Gleichungen 1 und 2 kombiniert und zu einer neuen Gleichung (3) [Grädler et al., 2001] umgeformt.

$$v_0 = \frac{v_{\max} \cdot c(S)}{K_m + c(S)} \quad \cup \quad v_i = \frac{v_{\max} \cdot c(S)}{K_m \cdot \left(1 + \frac{c(I)}{K_i}\right) + c(S)}$$

$$\Rightarrow \frac{v_0}{v_i} \cdot \frac{K_m + c(S)}{K_m} = \frac{1}{K_i} \cdot c(I) + \left(\frac{c(S)}{K_m} + 1\right) \quad (3)$$

- $v_0$ : Anfangsgeschwindigkeit ohne Inhibitorzugabe  
 $v_i$ : Anfangsgeschwindigkeit mit Inhibitorzugabe  
 $K_m$ : Michaeliskontante bezüglich der tRNA

$c(S)$ : tRNA<sup>Tyr</sup> Konzentration  
 $c(I)$ : Inhibitorkonzentration  
 $K_i$ : kompetitive Inhibitionskonstante

Für den  $K_m$ -Wert des Heterodimers (QTRT1/QTRTD1v1) aus der Maus wurde der in dieser Arbeit ermittelte Wert von 2  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Aus der Auftragung von  $\frac{v_0}{v_i} \cdot \frac{K_m + c(S)}{K_m}$  gegen die aufsteigenden Inhibitorkonzentrationen [ $\mu\text{M}$ ] nach Gleichung 3 und linearer Regression mit dem Programm GraFit 4 [Leatherbarrow, 1999] wurde aus dem Kehrwert der Steigung der Regressionsgerade die Inhibitionskonstante ( $K_i$ -Wert) eines kompetitiven Inhibitors berechnet.

### 3.3.10 Thermophorese

Der Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor®647 wurde zunächst in 100 % DMSO gelöst und anschließend mit in dem Kit beigefügten *Labeling*-Puffer auf eine Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  verdünnt. Anschließend wurde eine 10  $\mu\text{M}$  mQTRTD1v1/mQTRT1-Lösung mit dem Alexa Fluor®647 Succinimidylester bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss für 30 min im Verhältnis 1:1 inkubiert. Nicht gebundenes Alexa Fluor®647 wurde mittels einer mit 500 mM NaCl, 2 mM DTT und 20 mM HEPES pH 7,0 konditionierten NAP5-Sephadex-Säule entfernt. Die Alexa Fluor®647-QTRTD1 (500 mM NaCl, 2 mM DTT, 20 mM Hepes, pH 7,0) /-QTRT1 (100 mM NaCl, 2 mM DTT, 10 mM Tris, pH 7,5) Lösung wurde auf eine Konzentration von 100 nM mit einem Puffer, der aus 500 mM NaCl, 2 mM DTT, 20 mM HEPES pH 7,0 und 0,05 % Tween 20 bestand, verdünnt. Alle zu vermessenden natürlichen Substrate (preQ<sub>1</sub>, Queuin, Guanin, tRNA) und mQTRT1 wurden mit dem gleichen Puffer verdünnt. Jede Messung bestand aus jeweils 15 Proben einer 1:1 Verdünnungsserie. Jede Probe einer Messreihe wurde zunächst im Verhältnis 1:1 mit der Fluor®647-mQTRTD1v1/-mQTRT1-Lösung verdünnt und für 30 bis 60 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Die finale Konzentration von Alexa Fluor®647-mQTRTD1v1/-mQTRT1 betrug 50 nM. Die preQ<sub>1</sub>-Konzentration betrug zwischen 5  $\mu\text{M}$  und 2,2 nM, die Queuin-Konzentration zwischen 4  $\mu\text{M}$  und 1,8 nM, die Guanin-Konzentration zwischen 4  $\mu\text{M}$  und 1,8 nM, die tRNA<sup>Tyr</sup>-Konzentration zwischen 20  $\mu\text{M}$  und 9 nM und die mQTRT1-Konzentration zwischen 4  $\mu\text{M}$  und 1,8 nM. Vor der Messung wurden die Proben für 10 min bei 10000  $\times$  g und 4 °C zentrifugiert. Etwa 2  $\mu\text{L}$  jeder Probe wurden in die Monolith NT Standard-Glaskapillaren (NanoTemper Technologies GmbH)

gesaugt. Mit dem Instrument Nanolith NT 015 (NanoTemper Technologies GmbH) wurde die Thermophorese (Thermodiffusion) jeder der 15 Proben einer Messreihe bei Raumtemperatur für 13 s, bei 80 % LED power und 40 % Laser power gemessen. Um die Bindungsaffinität der QTRT1- und QTRTD1v1-Untereinheiten zueinander zu bestimmen wurden die QTRTD1-Konzentration konstant gehalten (50 nM), wogegen die QTRT1 Konzentration zwischen 4 µM und 1,8 nM variiert wurde. Es wurde von jedem Liganden und der mQTRT1 voneinander unabhängige Dreifachmessungen durchgeführt. Für das Fitting der Messkurven und die  $K_D$ -Kalkulation wurde das Programm NanoTemper Analysis 1.2.009 (NanoTemper Technologies GmbH), basierend auf der folgenden Gleichung 4, benutzt [Wienken *et al.* 2010]:

$$T = U + (B - U) \cdot \frac{(c_P + c_i + K_D) - \sqrt{(c_P + c_i + K_D)^2 - 4 \cdot c_P \cdot c_i}}{2 \cdot c_P} \quad (4)$$

- T : Thermophoresesignal  
 U : minimales Signal (freies Protein)  
 B : maximales Signal (mit dem Ligand gesättigtes Protein)  
 $c_P$ : Konzentration des fluoreszenzmarkierten Proteins  
 $c_i$ : Konzentration des Liganden  
 $K_D$  Dissoziationskonstante

### 3.3.11 Dynamische Lichtstreuungen (DLS)

Mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) wurden hochkonzentrierte Proteinlösungen (5 mg/mL) auf ihre Dispersität hin untersucht. Diese Methode ermöglicht nicht nur die Bestimmung von Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung sondern auch die zeitliche Verfolgung von Aggregatbildung. Alle Messungen wurden am Gerät Spectro Size 300 (Nano Biochem Technology (NaBiTec)) in der Arbeitsgruppe von Prof. Betzel am Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Hamburg durchgeführt. Die zu vermessenden Proteinproben wurden aufgetaut und auf Eis gelagert. Zunächst wurden die Proteinproben bei 4 °C für 5 min und 60 min bei 16000 g zentrifugiert. Anschließend wurden 10 µL der Proben in eine Küvette luftblasenfrei pipettiert, die Küvette in der Messkammer positioniert und die Messung gestartet. Dabei dauerte jede Messung 30 sec und wurde 25-mal hintereinander wiederholt. Die Partikelgröße und die Partikelgrößenverteilung wurden schließlich in der Histogramm- und *carpet*-Darstellung dargestellt.

### 3.3.12 HPLC-MS Experimente

Alle HPLC-MS-Experimente im Rahmen dieser Arbeit wurden vom Massenspektrometrieteam unter der Leitung von Dr. Uwe Linne an der Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie durchgeführt.

### 3.3.13 Thermal Shift Assay

Alle Thermal Shift Messungen wurden von Dr. Stephane Boivin am EMBL in Hamburg durchgeführt. Eine Beschreibung der Methode sowie ein genaues Protokoll für ihre Durchführung findet sich in Niesen et al. (2007).

### 3.3.14 ESI-MS Experimente unter nativen Bedingungen

Alle im Rahmen dieser Arbeit aufgeführten nicht-fragmentierenden ESI-MS- (Elektrospray-Ionisation gekoppelt mit Massenspektrometrie) Experimente unter nativen Bedingungen wurden im Labor der Massenspektrometrie für biologische Chemie in Straßburg - IPHC-DSA-LSMBO- in Zusammenarbeit mit Stéphanie Petiot-Bécard und Dr. Sarah Cianferani-Sangler durchgeführt. Unter Anderem wurde diese Methode für die Bestimmung der Quartärstrukturen der mQTRT1, hQTRT1, mQTRTD1v1 sowie des Heterodimers bestehend aus mQTRT1/mQTRTD1v1 herangezogen. Des Weiteren wurden für die Untersuchung der kinetischen Abläufe der Komplexbildung des Heterodimers bestehend aus der mQTRT1/mQTRTD1v1 und der tRNA sowie für Studien über den Einfluss der Ionenstärke auf die Stabilität des Komplexes mQTRT1/mQTRTD1v1/tRNA und für Bindungsexperimente der tRNA an mQTRT1 und mQTRTD1v1 nichtfragmentierte ESI-MS Experimente unter nativen Bedingungen durchgeführt. Die Proteinproben und Substratproben wurden zunächst mit Gelfiltrationssäulen (Zeba 0,5 mL, Pierce) in einen Ammoniumacetatpuffer umgepuffert. Nach dem Pufferaustausch wurde die Proteinkonzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm erneut bestimmt. Durchgeführt wurden die ESI-MS-Messungen bei einer Kapillarspannung ( $V_{\text{ESI}}$ ) von 1,8 kV und einem Druck ( $P_b$ ) von 0,8 psi. Die Beschleunigungsspannung ( $V_c$ ) und der Grenzflächendruck ( $P_i$ ) wurden an die experimentellen Gegebenheiten angepasst.

### 3.3.15 Kristallisation/Screening

Um nach geeigneten Bedingungen für die Kristallisation der untersuchten Zielproteine zu suchen, wurden *Inhouse*-Kristallisations-Screens (Tabelle 23 b) sowie Kristallisations-Screens

der Firma Qiagen (Tabelle 23 a) eingesetzt. Gearbeitet wurde mit der Methode der Dampfdiffusion und dem *Sitting-Drop*-Verfahren. Beim Ansetzen der Kristallisationsscreens wurde die Proteinkonzentration, der Puffer, die Temperatur und die Proteinlänge variiert. Alle *Inhouse*-Kristallisations-Screens wurden manuell pipettiert. Dabei betrug das Reservoirvolumen 1 mL und das Volumen der Kristallisationstropfen 2  $\mu$ L (zusammengesetzt aus 1  $\mu$ L konzentrierter Proteinlösung und 1  $\mu$ L Kristallisationspuffer). Kristallisations-Screens der Firma Qiagen wurden durch den Pipettierroboter Cartesian Microsys™ SQ 4000 oder den "honey bee", erstellt. Dabei betrug das Reservoirvolumen 80  $\mu$ L und das Volumen der Kristallisationstropfen 0,30  $\mu$ L (zusammengesetzt aus 0,15  $\mu$ L konzentrierter Proteinlösung und 0,15  $\mu$ L Kristallisationspuffer). Die Kristallisationsplatten wurden unverzüglich nach dem Pipettieren luftdicht abgeklebt. Die Kristallisationstropfen wurden in regelmäßigen Abständen visuell auf das Vorhandensein von Kristallen untersucht. Alle beobachteten Kristalle wurden zunächst mit dem *Izit crystal dye* (Hampton Research) angefärbt, um Salzkristalle von Proteinkristallen unterscheiden zu können. Anschließend wurde versucht, die Proteinkristalle zu reproduzieren. Bei erfolgreicher Reproduktion wurden die Kristalle schließlich an einem *inhouse* Röntgendiffraktometer mit der Röntgenröhre I $\mu$ S der Firma Incoatec und einem mar345-Detektor auf ihr Streuvermögen getestet.

**a**

Cryos Suite
Classics Suite
Classics lite Suite
PACT Suite
JCSG+ Suite
JCSG Core I Suite
JCSG Core II Suite
JCSG Core III Suite
JCSG Core IV Suite
MbClass Suite
MbClass II Suite

**b**

Wizard I
Wizard II
Cryo I
Cryo II
PEG/Ionen
Crystal-Screen

**Tabelle 23:**

a: Kristallisationsscreens der Firma Qiagen

b: *Inhouse*-Kristallisations-Screens



### 3.3.16 Kristallisation der QTRTD1v1 aus der Maus

Die Proteinkonzentration der eingesetzten mQTRTD1v1-Präparation betrug 7 mg/mL. Gearbeitet wurde mit der Methode der Dampfdiffusion und dem „*Sitting-Drop*“-Verfahren. Vor Fertigstellung der Kristallisationsansätze wurde die konzentrierte Proteinlösung für 60 min bei mindestens  $16000 \times g$  zentrifugiert, um eine monodisperse Proteinlösung zu erhalten. 1 mL der Kristallisationslösung (0,2 M Natriummalonat; 0,1 M Bis-Tris-propan pH 6,5; 25 % PEG 3350) wurde als Reservoir verwendet. Ein Kristallisationstropfen setzte sich aus 1  $\mu$ L konzentrierter Proteinlösung und 1  $\mu$ L Kristallisationslösung zusammen. Die Äquilibration des Kristallisationsansatzes erfolgte bei 16 bis 18 °C. Nach zwei bis drei Tagen konnten größere Kristallverbünde beobachtet werden. Die größten Kristalle wurden von dem Kristallverbund vorsichtig abgebrochen. Kristalle ohne sichtbare Risse wurden für die Datensammlung eingesetzt.

### 3.3.17 Röntgenstrukturanalyse und Strukturlösung der QTRTD1v1 aus der Maus

Für die Datensammlung wurden die Kristalle zunächst in einen Kryopuffer bestehend aus 0,2 M Natriummalonat, 0,1 M Bis-Tris-propan pH 6,5 und dem Kryoprotectivum 35 % PEG 3350, überführt. Anschließend wurden sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Datensammlung wurde bei einer Temperatur von 100 K durchgeführt und erfolgte mit Hilfe von Synchrotronstrahlung an der Beamline 14.1 bzw. 14.2 des Synchrotrons BESSY II (Helmholz-Zentrum in Berlin). Die gesammelten Daten wurden mit dem Programm XDSAPP [Krug et al., 2012] prozessiert und mit dem Programm SCALA [Evans, 2011] skaliert. Die Phasenbestimmung und Strukturlösung erfolgte mit Hilfe der Methode des Molekularen Ersatzes (*Molecular Replacement*) mittels des Programms PHASER [McCoy et al., 2007]. Als Modell wurden die Koordinaten der Struktur mit dem PDB-Code 2ASH [Crystal structure of queueine tRNA-ribosyltransferase (EC 2.4.2.29) (tRNA-guanine (tm1561) from *Thermotoga maritima* at 1.90 Å resolution)] verwendet. Für die Berechnung des freien R-Wertes wurden 5 % der Daten verwendet. Mit dem Programm PHENIX [Adams et al. 2010] wurde zu Beginn der Strukturverfeinerung ein *Rigid Body Refinement* und ein *Simulated Annealing* bei einer Starttemperatur von 5000 °C durchgeführt. In den nächsten Verfeinerungsschritten wurden in jeweils fünf Zyklen die individuellen Koordinaten und der B-Faktor verfeinert. Zwischen den Verfeinerungsschritten wurde das Modell mit dem Programm COOT [Emsley and Cowtan 2004] an die  $2F_0-F_c$ - sowie  $F_0-F_c$  Elektronendichte angepasst. Wassermoleküle wurden

manuell in die Elektronendichte eingefügt. Schließlich wurde eine TLS (Translation Libration Screw-motion) Verfeinerung der finalen Struktur durchgeführt. Ramachandran-Plots wurden mit dem Programm PROCHECK [Laskowski et al. 1993] erstellt. Der Matthews-Koeffizient und der Lösungsmittelanteil wurden mittels des Servers [www.ruppweb.org/Mattprob](http://www.ruppweb.org/Mattprob) berechnet. Alle gezeigten Abbildungen der finalen Struktur wurden mit dem Programm PyMOL [Schrödinger] erstellt.

### 3.4. Anhang

*NheI* *BstBI*

AAATGGCTAGCTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAATCTGGTGGTGGTGGTGGTCTGGTTC

1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

TTTACCGATCGACCTCGGTGGGCGTCAAGCTTTTGTAGACCACCACCACCACCAGACCAAG

*NcoI*

CGCGTGGCTCCATGGCAGCAGTTGGTAGTCCGGGTAGCCTGGAAAGCGCACCGCGTATTA

61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

GCGCACCGAGGTACCGTCGTCAACCATCAGGCCCATCGGACCTTTCGCGTGGCGCATAAT

M \_ A \_ A \_ V \_ G \_ S \_ P \_ G \_ S \_ L \_ E \_ S \_ A \_ P \_ R \_ I \_ M

TGCGTCTGGTTGCAGAATGTAGCCGTAGCGGTGCACGTGCCGGTGAACTGCGTCTGCCGC

121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

ACGCAGACCAACGTCTTACATCGGCATCGCCACGTGCACGGCCACTTGACGCAGACGGCG

\_ R \_ L \_ V \_ A \_ E \_ C \_ S \_ R \_ S \_ G \_ A \_ R \_ A \_ G \_ E \_ L \_ R \_ L \_ P \_ H

*AgeI*

ATGGCACCGTTGCAACACCGGTTTTTATGCCGGTTGGCACCCAGGCAACCATGAAAGGTA

181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

TACCGTGGCAACGTGTGGCCAAAAATACGGCCAACCGTGGGTCCGTTGGTACTTTCCAT

\_ G \_ T \_ V \_ A \_ T \_ P \_ V \_ F \_ M \_ P \_ V \_ G \_ T \_ Q \_ A \_ T \_ M \_ K \_ G \_ I

*PvuII*

TTACCACCGAACAGCTGGATAGCCTGGGTGTGCGTATTTGTCTGGGTAATACCTATCATC

241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

AATGGTGGCTTGTGACCTATCGGACCCAACAGCATAAACAGACCCATTATGGATAGTAG

\_ T \_ T \_ E \_ Q \_ L \_ D \_ S \_ L \_ G \_ C \_ R \_ I \_ C \_ L \_ G \_ N \_ T \_ Y \_ H \_ L

TGGGTCTGCGTCCGGGTCCGGAAGTATTCGTAAAGCACAGGGTCTGCATGGTTTTATGA

301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+

ACCCAGACGCAGGCCAGGCCTTGAATAAGCATTTTCGTGTCCAGACGTACCAAAATACT

\_ G \_ L \_ R \_ P \_ G \_ P \_ E \_ L \_ I \_ R \_ K \_ A \_ Q \_ G \_ L \_ H \_ G \_ F \_ M \_ N

ATTGGCCTCATAATCTGCTGACCGATAGCGGTGGTTTTTCAGATGGTTAGCCTGTTTAGCC  
 361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TAACCGGAGTATTAGACGACTGGCTATCGCCACCAAAAGTCTACCAATCGGACAAATCGG  
 \_W\_P\_H\_N\_L\_L\_T\_D\_S\_G\_G\_F\_Q\_M\_V\_S\_L\_F\_S\_L

TGAGCGAAGTTACCGAAGAAGGTGTTTTCGTAGCCCGTATGATGGTGAAGAAACCC  
 421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 ACTCGCTTCAATGGCTTCTTCCACAAGTAAAAGCATCGGGCATACTACCACTTCTTTGGG  
 \_S\_E\_V\_T\_E\_E\_G\_V\_H\_F\_R\_S\_P\_Y\_D\_G\_E\_E\_T\_L

*EcoRV*                      *PvuII*

TGCTGAGTCCGGAACGTAGCGTTGAAATTCAGAATGCACTGGGTAGCGATATCATTATGC  
 481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 ACGACTCAGGCCTTGCATCGCAACTTTAAGTCTTACGTGACCCATCGCTATAGTAATACG  
 \_L\_S\_P\_E\_R\_S\_V\_E\_I\_Q\_N\_A\_L\_G\_S\_D\_I\_I\_M\_Q

*AgeI*

AGCTGGATCATGTTGTTAGCAGCACCGTTACCGGTCCGCTGGTTGAAGAAGCAATGCATC  
 541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TCGACCTAGTACAACAATCGTCGTGGCAATGGCCAGGCGACCAACTTCTTCGTTACGTAG  
 \_L\_D\_H\_V\_V\_S\_S\_T\_V\_T\_G\_P\_L\_V\_E\_E\_A\_M\_H\_R

GTAGCGTTCGTTGGCTGGATCGTTGTATTGCAGCACATAAACATCCGGATAAACAGAACC  
 601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CATCGCAAGCAACCGACCTAGCAACATAACGTGCGTGATTTGTAGGCCTATTTGTCTTGG  
 \_S\_V\_R\_W\_L\_D\_R\_C\_I\_A\_A\_H\_K\_H\_P\_D\_K\_Q\_N\_L

*BglII*

TGTTTGCCATTATTCAGGGTGGTCTGAATGCAGATCTGCGTACCACCTGTCTGAAAGAAA  
 661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 ACAAACGGTAATAAGTCCCACCAGACTTACGTCTAGACGCATGGTGGACAGACTTTCTTT  
 \_F\_A\_I\_I\_Q\_G\_G\_L\_N\_A\_D\_L\_R\_T\_T\_C\_L\_K\_E\_M

TGACCAAACGTGATGTTCCGGGTTTTGCAATTGGTGGTCTGAGCGGTGGTGAAAGCAAAG  
 721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 ACTGGTTTGCCTACAAGGCCCAAAACGTTAACCACCAGACTCGCCACCACTTTCGTTTC  
 \_T\_K\_R\_D\_V\_P\_G\_F\_A\_I\_G\_G\_L\_S\_G\_G\_E\_S\_K\_A

*SphI*

CACAGTTTTGGAAAATGGTTGCACTGAGCACCAGCATGCTGCCGAAAGATAAAACCGCGTT  
 781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 GTGTCAAAACCTTTTACCAACGTGACTCGTGGTCTGACGACGGCTTTCTATTTGGCGCAA  
 \_Q\_F\_W\_K\_M\_V\_A\_L\_S\_T\_S\_M\_L\_P\_K\_D\_K\_P\_R\_Y

ATCTGATGGGTGTTGGTTATGCAACCGATCTGGTTGTTTGTGTTGCACTGGGTTGTGATA  
 841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TAGACTACCCACAACCAATACGTTGGCTAGACCAACAAACACAACGTGACCCAACACTAT  
 \_L\_M\_G\_V\_G\_Y\_A\_T\_D\_L\_V\_V\_C\_V\_A\_L\_G\_C\_D\_M

*AgeI*

TGTTTGATTGTGTTTATCCGACCCGTACCGCACGTTTTGGTAGCGCACTGGTTCCGACCG  
 901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 ACAAACTAACACAAATAGGCTGGGCATGGCGTGCAAAACCATCGCGTGACCAAGGCTGGC  
 \_F\_D\_C\_V\_Y\_P\_T\_R\_T\_A\_R\_F\_G\_S\_A\_L\_V\_P\_T\_G

*PvuII**PstI*

GTAATCTGCAGCTGAAAAAAAAACAGTATGCCAAAGATTTTAGCCCGATTAATCCGGAAT  
 961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CATTAGACGTCGACTTTTTTTTTGTCATACGGTTTCTAAAATCGGGCTAATTAGGCCTTA  
 \_N\_L\_Q\_L\_K\_K\_Q\_Y\_A\_K\_D\_F\_S\_P\_I\_N\_P\_E\_C

*SphI*

GTCCGTGTCCGACCTGTCAGACCCATAGCCGTGCATTTCTGCATGCACTGCTGCATAGCG  
 1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CAGGCACAGGCTGGACAGTCTGGGTATCGGCACGTAAAGACGTACGTGACGACGTATCGC  
 \_P\_C\_P\_T\_C\_Q\_T\_H\_S\_R\_A\_F\_L\_H\_A\_L\_L\_H\_S\_D

*PvuII PvuII**PstI*

ATAATACCACCGCACTGCATCATCTGACCGTTTCATAATATTGCATATCAGCTGCAGCTGC  
 1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TATTATGGTGGCGTGACGTAGTAGACTGGCAAGTATTATAACGTATAGTCGACGTGACG  
 \_N\_T\_T\_A\_L\_H\_H\_L\_T\_V\_H\_N\_I\_A\_Y\_Q\_L\_Q\_L\_L

```

      TGAGCGCAGTTCGTAGCAGCATTCTGGAACAGCGTTTTCCGGATTTTGTGCGTAATTTTA
1141  -----+-----+-----+-----+-----+-----+
      ACTCGCGTCAAGCATCGTCGTAAGACCTTGTGC AAAAGGCCTAAAACACGCATTAAAT
      _S_A_V_R_S_S_I_L_E_Q_R_F_P_D_F_V_R_N_F_M

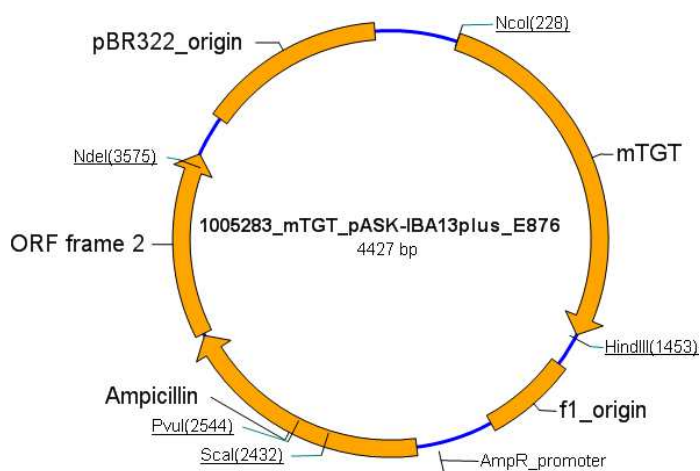
      TGGGTACCATGTATGGCGATCATAGCCTGTGTCCGGCATGGGCAGTTGAAGCACTGGCAA
1201  -----+-----+-----+-----+-----+-----+
      ACGCATGGTACATACCGCTAGTATCGGACACAGGCCGTACCCGTCAACTTCGTGACCGTT
      _R_T_M_Y_G_D_H_S_L_C_P_A_W_A_V_E_A_L_A_S

                                     EcoRV      HindIII
      GCGTTGGTATTATGCTGACCTAAGATATCTAACTAAGCTTGACCTGTGAAGTGAAAAATG
1261  -----+-----+-----+-----+-----+-----+
      CGCAACCATAATACGACTGGATTCTATAGATTGATTCGAACTGGACACTTCACCTTTTAC
      _V_G_I_M_L_T_*_

      GCGCACA
1321  -----
      CGCGTGT

```

**Abbildung 74:** DNA- und Aminosäuresequenz der QTRT1 aus der Maus mit Restriktionsschnittstellen



**Abbildung 75:** Vektorkarte des Plasmids pASK-IBA13 plus\_mTGT

*BsaI*

GGTGGTGGTGGTCTGGTTCCGCGTGGCTCCCGAGACCGCATGATGAAACTGAGCCTGATT  
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CCACCACCACCAGACCAAGGCGCACCGAGGGCTCTGGCGTACTACTTTGACTCGGACTAA  
                   R \_ D \_ R \_ M \_ M \_ K \_ L \_ S \_ L \_ I \_

AAAGTTGTTAATGGTTGTCGCCTGGGCAAAATTCAGAATCTGGGTAAAGCCGGTGATTGT  
 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TTTCAACAATTACCAACAGCGGACCCGTTTAAAGTCTTAGACCCATTTTCGGCCACTAACA  
 K \_ V \_ V \_ N \_ G \_ C \_ R \_ L \_ G \_ K \_ I \_ Q \_ N \_ L \_ G \_ K \_ A \_ G \_ D \_ C \_

*AccI**AgeI*

ACCGTTGATATTCCGGGTTGTCTGCTGTATACCCGTACCGGTAGCGCACCGCATCTGACC  
 121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TGGCAACTATAAGGCCCAACAGACGACATATGGGCATGGCCATCGCGTGGCGTAGACTGG  
 T \_ V \_ D \_ I \_ P \_ G \_ C \_ L \_ L \_ Y \_ T \_ R \_ T \_ G \_ S \_ A \_ P \_ H \_ L \_ T \_

*PvuII*

CATCAGACCCTGCGCAATATTCATGGTGTTCGGGTATTGCACAGCTGACCCTGAGCAGC  
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 GTAGTCTGGGACGCGTTATAAGTACCACAAGGCCCATAACGTGTCGACTGGGACTCGTCG  
 H \_ Q \_ T \_ L \_ R \_ N \_ I \_ H \_ G \_ V \_ P \_ G \_ I \_ A \_ Q \_ L \_ T \_ L \_ S \_ S \_

CTGGCAGAGCATCATGAAGTTCTGGCCGAATATAAAAAAGGTGTGGGTAGCTTTATTGGT  
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 GACCGTCTCGTAGTACTTCAAGACCGGCTTATATTTTTTCCACACCCATCGAAATAACCA  
 L \_ A \_ E \_ H \_ H \_ E \_ V \_ L \_ A \_ E \_ Y \_ K \_ K \_ G \_ V \_ G \_ S \_ F \_ I \_ G \_

*Bsp*MI

ATGCCGGAAGCCTGTTTTATTGTAGCCTGCATGATCCGGTTACACCGGGTCCGGCAGGT  
 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TACGGCCTTTTCGGACAAAATAACATCGGACGTACTAGGCCAATGTGGCCCAGGCCGTCCA  
 M \_ P \_ E \_ S \_ L \_ F \_ Y \_ C \_ S \_ L \_ H \_ D \_ P \_ V \_ T \_ P \_ G \_ P \_ A \_ G \_

TATGTGACCAGCAAAAGCGTTAGCGTTTGGGGTTTTGGTGGTCGTGTTGAAATGACCGTT  
 361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 ATACACTGGTCGTTTTTCGCAATCGCAAACCCCAAACACCAGCACAACTTTACTGGCAA  
 Y \_ V \_ T \_ S \_ K \_ S \_ V \_ S \_ V \_ W \_ G \_ F \_ G \_ G \_ R \_ V \_ E \_ M \_ T \_ V \_

*Pst*I

AGCAAATTTATGGCAATTCAGGAAGCACTGCAGCCGGATTGGTTTCAGTGTCTGAGTGAT  
 421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TCGTTTAAATACCGTTAAGTCCTTCGTGACGTCGGCCTAACCAAAGTCACAGACTCACTA  
 S \_ K \_ F \_ M \_ A \_ I \_ Q \_ E \_ A \_ L \_ Q \_ P \_ D \_ W \_ F \_ Q \_ C \_ L \_ S \_ D \_

GGTGAAGCAAGCTGTGCAGAAACCACCAGTATTAAACGTGCACGTAAAAGCGTTGATCGT  
 481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CCACTTCGTTTCGACACGTCTTTGGTGGTCATAATTTGCACGTGCATTTTCGCAACTAGCA  
 G \_ E \_ A \_ S \_ C \_ A \_ E \_ T \_ T \_ S \_ I \_ K \_ R \_ A \_ R \_ K \_ S \_ V \_ D \_ R \_

*Pst*I*Pst*I

AGCCTGCTGTTTCTGGATAGCTGTCTGCGTCTGCAGGAAGAAAGCGAAGTTCTGCAGAAA  
 541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TCGGACGACAAAGACCTATCGACAGACGCAGACGTCCTTCTTTTCGCTTCAAGACGTCTTT  
 S \_ L \_ L \_ F \_ L \_ D \_ S \_ C \_ L \_ R \_ L \_ Q \_ E \_ E \_ S \_ E \_ V \_ L \_ Q \_ K \_

AGCGTTATTATTGGTGTGATTGAAGGCGGTGATGTTATGGAAGAACGTCTGCGTAGCGCA  
 601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TCGCAATAATAACCACACTAACTTCCGCCACTACAATACCTTCTTGCAGACGCATCGCGT  
 S \_ V \_ I \_ I \_ G \_ V \_ I \_ E \_ G \_ G \_ D \_ V \_ M \_ E \_ E \_ R \_ L \_ R \_ S \_ A \_

CGTGAAACCGCAAAACGTCCGGTTGGTGGTTTTCTGCTGGATGGTTTTTCAGGGTGATCCG  
 661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 GCACTTTGGCGTTTTGCAGGCCAACCAACCAAAAGACGACCTACCAAAAGTCCCACTAGGC  
 R \_ E \_ T \_ A \_ K \_ R \_ P \_ V \_ G \_ G \_ F \_ L \_ L \_ D \_ G \_ F \_ Q \_ G \_ D \_ P \_



GCAGTTACCGAAACCCGTCTGCATCTGCTGAGCAGCGTTACCGCAGAACTGCCGGAAGAT  
 721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CGTCAATGGCCTTTGGGCAGACGTAGACGACTCGTCGCAATGGCGTCTTGACGGCCTTCTA  
 A\_V\_T\_E\_T\_R\_L\_H\_L\_L\_S\_S\_V\_T\_A\_E\_L\_P\_E\_D\_

AAACCGCGTCTGATTTGTGGTGTTAGCCGTCCGGATGAAGTGCTGGAATGTATTGAACGT  
 781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TTTGGCGCAGACTAAACACCACAATCGGCAGGCCTACTTCACGACCTTACATAACTTGCA  
 K\_P\_R\_L\_I\_C\_G\_V\_S\_R\_P\_D\_E\_V\_L\_E\_C\_I\_E\_R\_

*HincII*

*BstEII*

GGTGTGACCTGTTTGAATCATTTTTTCCGTATCAGGTTACCGAACGTGGTTGTGCACTG  
 841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CCACAACCTGGACAAACTTAGTAAAAAAGGCATAGTCCAATGGCTTGCACCAACACGTGAC  
 G\_V\_D\_L\_F\_E\_S\_F\_F\_P\_Y\_Q\_V\_T\_E\_R\_G\_C\_A\_L\_

*PvuII*

ACCTTTACCTTTGATTGTCAGCTGAATCCGGAAGAAACCCTGCTGCAACAGAATGGTATT  
 901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TGGAAATGGAACTAACAGTCTGACTTAGGCCTTCTTTGGGACGACGTTGTCTTACCATAA  
 T\_F\_T\_F\_D\_C\_Q\_L\_N\_P\_E\_E\_T\_L\_L\_Q\_Q\_N\_G\_I\_

*AgeI*

CAGGAAAAAATTAAAGGTCTGGATCAGGCCAAAAAATTGAAGCAACCGGTTGTAATCAG  
 961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 GTCCTTTTTTTAATTTCCAGACCTAGTCCGGTTTTTTTAACTTCGTTGGCCAACATTAGTC  
 Q\_E\_K\_I\_K\_G\_L\_D\_Q\_A\_K\_K\_I\_E\_A\_T\_G\_C\_N\_Q\_

GAAATGACCAGCTTTGAAATTAATCTGAAAGAAAAGAAATATCAGGAAGATTTTGATCCG  
 1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CTTTACTGGTCGAAACTTTAATTAGACTTTCTTTTCTTTATAGTCCTTCTAAAACTAGGC  
 E\_M\_T\_S\_F\_E\_I\_N\_L\_K\_E\_K\_K\_Y\_Q\_E\_D\_F\_D\_P\_

CTGGTTCGTGGTTGTAGCTGTTATTGTTGCAAAAATCATACCCGTGCCTATATTCATCAT  
 1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 GACCAAGCACCAACATCGACAATAACAACGTTTTTTAGTATGGGCACGGATATAAGTAGTA  
 L\_V\_R\_G\_C\_S\_C\_Y\_C\_C\_K\_N\_H\_T\_R\_A\_Y\_I\_H\_H\_

```

CTGCTGATGACCAATGAACTGCTGGCAGGCGTTCTGCTGATGATGCATAATTTTGAACAT
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
GACGACTACTGGTTACTTTGACGACCGTCCGCAAGACGACTACTACGTATTAAAACTTGTA
L_L_M_T_N_E_L_L_A_G_V_L_L_M_M_H_N_F_E_H_

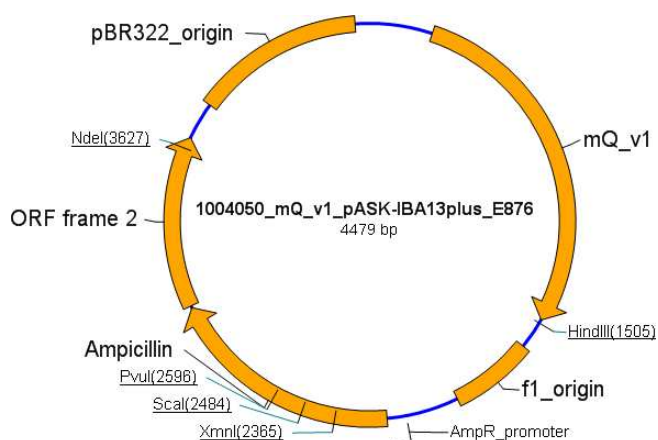
PvuII
TATTTTGGCTTTTTTGCAGCATTTCGCGAAGCCCTGAAAAATGATACCCTGGCACAGCTG
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATAAAACCGAAAAAACGTCGTAAGCGCTTCGGGACTTTTTACTATGGGACCGTGTGAC
Y_F_G_F_F_C_S_I_R_E_A_L_K_N_D_T_L_A_Q_L_

BsaI   EcoRV   HindIII
AAAGAACTGATTTGTCGTCAGATGTTTGGTCTCTGATATCTAACTAAGCTTGACCTGTGA
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTTCTTGACTAAACAGCAGTCTACAAACCAGAGACTATAGATTGATTCGAACTGGACACT
K_E_L_I_C_R_Q_M_F_G_L_

AGTG
1321 ----
TCAC

```

**Abbildung 76:** DNA- und Aminosäuresequenz der QTRTD1v1 aus der Maus mit Restriktionsschnittstellen



**Abbildung 77:** Vektorkarte des Plamids pASK-IBA13 plus\_mQv1

*NcoI*

CTGGTGGTGGTGGTGGTCTGGTTCCGCGTGGCTCCATGGCTGGTGCAGCAACCCAGGCAA  
 1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 GACCACCACCACCACCAGACCAAGGCGCACCGAGGTACCGACCACGTCGTTGGGTCCGTT  
                                   M  A  G  A  A  T  Q  A  S

GCCTGGAAAGCGCACCGCGTATTATGCGTCTGGTTGCAGAATGTAGCCGTAGCCGTGCTC  
 61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CGGACCTTTCGCGTGGCGCATAATACGCAGACCAACGTCTTACATCGGCATCGGCACGAG  
   L  E  S  A  P  R  I  M  R  L  V  A  E  C  S  R  S  R  A  R

*AgeI*

GTGCCGGTGAACTGTGGCTGCCGCATGGCACCGTTGCAACACCGGTTTTTATGCCGGTTG  
 121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CACGGCCACTTGACACCGACGGCGTACCGTGGCAACGTTGTGGCCAAAATACGGCCAAC  
   A  G  E  L  W  L  P  H  G  T  V  A  T  P  V  F  M  P  V  G

*PvuII*

GCACCCAGGCAACCATGAAAGGTATTACCACCGAACAGCTGGATGCACTGGGTGTGCGTA  
 181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CGTGGGTCCGTTGGTACTTTCCATAATGGTGGCTTGTGACCTACGTGACCCAACAGCAT  
   T  Q  A  T  M  K  G  I  T  T  E  Q  L  D  A  L  G  C  R  I

TTTGTCTGGGTAATACCTATCATCTGGGTCTGCGTCCGGGTCCGGAACTGATTGAGAAAG  
 241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 AAACAGACCCATTATGGATAGTAGACCCAGACGCAGGCCAGGCCTTGACTAAGTCTTTC  
   C  L  G  N  T  Y  H  L  G  L  R  P  G  P  E  L  I  Q  K  A

CAAATGGTCTGCATGGCTTTATGAATTGGCCTCATAATCTGCTGACCGATAGCGGTGGTT  
 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 GTTTACCAGACGTACCGAAATACTTAACCGGAGTATTAGACGACTGGCTATCGCCACCAA  
 \_N\_G\_L\_H\_G\_F\_M\_N\_W\_P\_H\_N\_L\_L\_T\_D\_S\_G\_G\_F

TTCAGATGGTTAGCCTGGTGAGCCTGAGCGAAGTTACCGAAGAAGGTGTTTCGTTTTCGTA  
 361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 AAGTCTACCAATCGGACCACTCGGACTCGCTTCAATGGCTTCTTCCACAAGCAAAAGCAT  
 \_Q\_M\_V\_S\_L\_V\_S\_L\_S\_E\_V\_T\_E\_E\_G\_V\_R\_F\_R\_S

CCCCGTATGATGGTAATGAAACCCCTGCTGAGTCCGGAAAAAAGCGTTCAGATTTCAGAATG  
 421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CGGGCATACTACCATTACTTTGGGACGACTCAGGCCTTTTTTCGCAAGTCTAAGTCTTAC  
 \_P\_Y\_D\_G\_N\_E\_T\_L\_L\_S\_P\_E\_K\_S\_V\_Q\_I\_Q\_N\_A

*EcoRV*                      *PvuII*                                      *AgeI*

CACTGGGTAGCGATATCATCATGCAGCTGGATGACGTTGTTAGCAGCACCGTTACCGGTC  
 481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 GTGACCCATCGCTATAGTAGTACGTCGACCTACTGCAACAATCGTCGTGGCAATGGCCAG  
 \_L\_G\_S\_D\_I\_I\_M\_Q\_L\_D\_D\_V\_V\_S\_S\_T\_V\_T\_G\_P

CGCGTGTTGAAGAAGCAATGTATCGTAGCATTTCGTTGGCTGGATCGTTGTATTGCAGCAC  
 541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 GCGCACAACTTCTTCGTTACATAGCATCGTAAGCAACCGACCTAGCAACATAACGTCGTG  
 \_R\_V\_E\_E\_A\_M\_Y\_R\_S\_I\_R\_W\_L\_D\_R\_C\_I\_A\_A\_H

*BglII*

ATCAGCGTCCGGATAAACAGAACCTGTTTGCAATTATTCAGGGTGGTCTGGATGCAGATC  
 601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TAGTCGCAGGCCTATTTGTCTTGGACAAACGTTAATAAGTCCCACCAGACCTACGTCTAG  
 \_Q\_R\_P\_D\_K\_Q\_N\_L\_F\_A\_I\_I\_Q\_G\_G\_L\_D\_A\_D\_L

TGCGTGCAACCTGTCTGGAAGAAATGACCAAACGTGATGTTCCGGGTTTTGCAATTGGTG  
 661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 ACGCACGTTGGACAGACCTTCTTTACTGGTTTGCCTACAAGGCCCAAAACGTTAACCAC  
 \_R\_A\_T\_C\_L\_E\_E\_M\_T\_K\_R\_D\_V\_P\_G\_F\_A\_I\_G\_G

GTCTGAGCGGTGGTGAAAGCAAAAGCCAGTTTTGGCGTATGGTTGCACTGAGCACCAGCC  
 721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CAGACTCGCCACCACTTTCGTTTTCGGTCAAACCGCATACCAACGTGACTCGTGGTCCG  
 \_L\_S\_G\_G\_E\_S\_K\_S\_Q\_F\_W\_R\_M\_V\_A\_L\_S\_T\_S\_R

GTCTGCCGAAAGATAAACCGCGTTATCTGATGGGTGTTGGTTATGCAACCGATCTGGTTG  
 781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CAGACGGCTTTCTATTTGGCGCAATAGACTACCCACAACCAATACGTTGGCTAGACCAAC  
 \_L\_P\_K\_D\_K\_P\_R\_Y\_L\_M\_G\_V\_G\_Y\_A\_T\_D\_L\_V\_V

TTTGTGTTGCCCTGGGTGTGATATGTTTGATTGTGTTTTTCCGACCCGTACCGCACGTT  
 841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 AAACACAACGGGACCCAACACTATACAACTAACACAAAAAGGCTGGGCATGGCGTGCAA  
 \_C\_V\_A\_L\_G\_C\_D\_M\_F\_D\_C\_V\_F\_P\_T\_R\_T\_A\_R\_F

*PvuII*

*AgeI*      *PstI*

TTGGTAGCGCACTGGTTCCGACCGGTAATCTGCAGCTGCGTAAAAAAGTGTTGAGAAAG  
 901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 AACCATCGCGTGACCAAGGCTGGCCATTAGACGTGACGCATTTTTTCAAGCTCTTTC  
 \_G\_S\_A\_L\_V\_P\_T\_G\_N\_L\_Q\_L\_R\_K\_K\_V\_F\_E\_K\_D

ATTTTGGTCCGATTGATCCGGAATGTACCTGTCCGACCTGTCAGAAACATAGCCGTGCAT  
 961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TAAAACCAGGCTAACTAGGCCTTACATGGACAGGCTGGACAGTCTTTGTATCGGCACGTA  
 \_F\_G\_P\_I\_D\_P\_E\_C\_T\_C\_P\_T\_C\_Q\_K\_H\_S\_R\_A\_F

*SphI*

TTCTGCATGCACTGCTGCATAGCGATAATACCGCAGCACTGCATCATCTGACCGTTCATA  
 1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 AAGACGTACGTGACGACGTATCGCTATTATGGCGTCGTGACGTAGTAGACTGGCAAGTAT  
 \_L\_H\_A\_L\_L\_H\_S\_D\_N\_T\_A\_A\_L\_H\_H\_L\_T\_V\_H\_N

*PvuII*

ATATTGCATATCAGCTGCAACTGATGAGCGCAGTTCGTACCAGCATTGTTGAAAAACGTT  
 1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TATAACGTATAGTCGACGTTGACTACTCGCGTCAAGCATGGTCGTAACAACCTTTTGGCAA  
 \_I\_A\_Y\_Q\_L\_Q\_L\_M\_S\_A\_V\_R\_T\_S\_I\_V\_E\_K\_R\_F

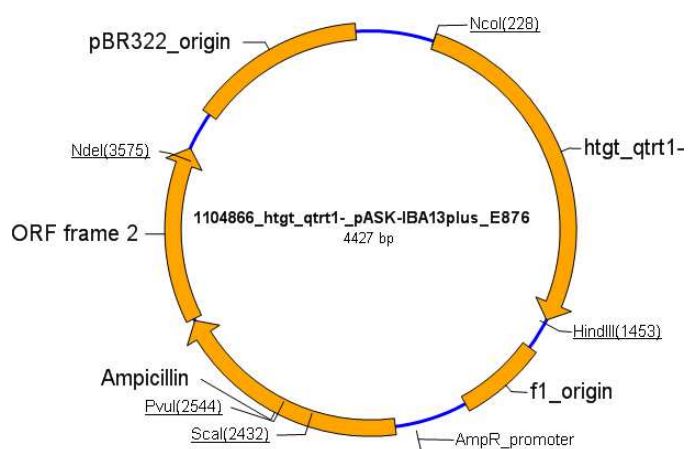
TTCCGGATTTTGTGCGCGATTTCATGGGTGCAATGTATGGTGATCCGACCCTGTGTCCGA  
 1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 AAGGCCTAAACACGCGCTAAAGTACCCACGTTACATACCACTAGGCTGGGACACAGGCT  
 \_P\_D\_F\_V\_R\_D\_F\_M\_G\_A\_M\_Y\_G\_D\_P\_T\_L\_C\_P\_T

*EcoRV*      *HindIII*

CCTGGGCAACCGATGCACTGGCAAGCGTTGGTATTACCCTGGGTTAAGATATCTAACTAA  
 1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 GGACCCGTTGGCTACGTGACCGTTCGCAACCATAATGGGACCCAATTCTATAGATTGATT  
 \_W\_A\_T\_D\_A\_L\_A\_S\_V\_G\_I\_T\_L\_G\_\*

GCTTGACCTGTGAAGTGAAAAA  
 1261 -----+-----+--  
 CGAACTGGACACTTCACTTTTT

**Abbildung 78:** DNA- und Aminosäuresequenz der QTRT1 aus dem Menschen mit Restriktionsschnittstellen



**Abbildung 79:** Vektorkarte des Plasmids pASK-IBA13 plus\_hTGT

CTGGTGGTGGTGGTGGTCTGGTTCCGCGTGGCTCCATGAAACTGAGCCTGACCAAAGTTG  
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
GACCACCACCACCACCAGACCAAGGCGCACCGAGGTACTTTGACTCGGACTGGTTTCAAC  
M\_K\_L\_S\_L\_T\_K\_V\_V

*AgeI BclI NcoI*

TTAATGGTTGTCGTCTGGGCAAAATCAAAAATCTGGGTAAAACCGGTGATCACACCATGG  
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
AATTACCAACAGCAGACCCGTTTTAGTTTTTAGACCCATTTTGGCCACTAGTGTGGTACC  
N\_G\_C\_R\_L\_G\_K\_I\_K\_N\_L\_G\_K\_T\_G\_D\_H\_T\_M\_D

*AccI AgeI*

ATATTCCGGGTTGTCTGCTGTATACCAAAACCGGTAGCGCACCGCATCTGACCCATCATA  
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
TATAAGGCCCAACAGACGACATATGGTTTTGGCCATCGCGTGGCGTAGACTGGGTAGTAT  
I\_P\_G\_C\_L\_L\_Y\_T\_K\_T\_G\_S\_A\_P\_H\_L\_T\_H\_H\_T

*PvuII*

CCCTGCATAACATTCATGGTGTTCGGGCAATGGCACAGCTGACCCTGAGCAGCCTGGCAG  
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
GGGACGTATTGTAAGTACCACAAGGCCGTTACCGTGTGCGACTGGGACTCGTCGGACCGTC  
L\_H\_N\_I\_H\_G\_V\_P\_A\_M\_A\_Q\_L\_T\_L\_S\_S\_L\_A\_E

AACATCATGAAGTGCTGACCGAATATAAAGAAGGTGTGGGCAAATTTATCGGTATGCCGG  
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
TTGTAGTACTTCACGACTGGCTTATATTTCTTCCACACCCGTTTAAATAGCCATACGGCC  
H\_H\_E\_V\_L\_T\_E\_Y\_K\_E\_G\_V\_G\_K\_F\_I\_G\_M\_P\_E

*BspMI*

AAAGCCTGCTGTATTGTAGCCTGCATGATCCGGTTAGCCCGTGTCCGGCAGGTTATGTTA  
 301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TTTTCGGACGACATAACATCGGACGTACTAGGCCAATCGGGCACAGGCCGTCCAATACAAT  
 \_S\_L\_L\_Y\_C\_S\_L\_H\_D\_P\_V\_S\_P\_C\_P\_A\_G\_Y\_V\_T

*BspMI*

CCAATAAAAGCGTTAGCGTTTGGAGCGTTGCAGGTCGTGTTGAAATGACCGTTAGCAAAT  
 361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 GGTATTATTTTCGCAATCGCAAACCTCGCAACGTCCAGCACAACTTTACTGGCAATCGTTTA  
 \_N\_K\_S\_V\_S\_V\_W\_S\_V\_A\_G\_R\_V\_E\_M\_T\_V\_S\_K\_F

*PstI*

TTATGGCCATTTCAGAAAGCACTGCAGCCGGATTGGTTTCAGTGTCTGAGTGATGGTGAAG  
 421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 AATACCGGTAAGTCTTTCGTGACGTGCGCCTAACCAAAGTCACAGACTCACTACCACTTC  
 \_M\_A\_I\_Q\_K\_A\_L\_Q\_P\_D\_W\_F\_Q\_C\_L\_S\_D\_G\_E\_V

TTAGCTGTAAAGAAGCGACCAGCATTAAACGTGTTTCGTAAAAGCGTTGATCGTAGCCTGC  
 481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 AATCGACATTTCTTCGCTGGTCGTAATTTGCACAAGCATTTTCGCAACTAGCATCGGACG  
 \_S\_C\_K\_E\_A\_T\_S\_I\_K\_R\_V\_R\_K\_S\_V\_D\_R\_S\_L\_L

*PstI*

TGTTTCTGGATAATTGTCTGCGTCTGCAAGAAGAAAGCGAAGTTCTGCAGAAAAGCGTTA  
 541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 ACAAGACCTATTAACAGACGCAGACGTTCTTCTTTTCGCTTCAAGACGTCTTTTCGCAAT  
 \_F\_L\_D\_N\_C\_L\_R\_L\_Q\_E\_E\_S\_E\_V\_L\_Q\_K\_S\_V\_I

TTATTGGTGTGATTGAAGGCGGTGATGTTATGGAAGAACGTCTGCGTAGCGCACGTGAAA  
 601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 AATAACCACACTAACTTCCGCCACTACAATACCTTCTTGCAGACGCATCGCGTGCACTTT  
 \_I\_G\_V\_I\_E\_G\_G\_D\_V\_M\_E\_E\_R\_L\_R\_S\_A\_R\_E\_T



CCGCAAAACGTCCGGTTGGTGGTTTTCTGCTGGATGGTTTTTCAGGGTAATCCGACCACCC  
 661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 GCGGTTTTGTCAGGCCAACCAACCAAAAGACGACCTACCAAAAGTCCCATTAGGCTGGTGGG  
 \_A\_K\_R\_P\_V\_G\_G\_F\_L\_L\_D\_G\_F\_Q\_G\_N\_P\_T\_T\_L

TGGAAGCCCGTCTGCGCCTGCTGAGCAGCGTTACCGCAGAACTGCCGGAAGATAAACCGC  
 721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 ACCTTCGGGCAGACGCGGACGACTCGTCGCAATGGCGTCTTGACGGCCTTCTATTTGGCG  
 \_E\_A\_R\_L\_R\_L\_L\_S\_S\_V\_T\_A\_E\_L\_P\_E\_D\_K\_P\_R

*HincII*

GTCTGATTAGCGGTGTTAGCCGTCCGGATGAAGTTCTGGAATGTATTGAACGTGGTGTG  
 781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CAGACTAATCGCCACAATCGGCAGGCCTACTTCAAGACCTTACATAACTTGCACCACAAC  
 \_L\_I\_S\_G\_V\_S\_R\_P\_D\_E\_V\_L\_E\_C\_I\_E\_R\_G\_V\_D

*BstEII*

ACCTGTTTGAATCCTTTTTTCCGTATCAGGTTACCGAACGTGGTTGTGCACTGACCTTTA  
 841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TGGACAAACTTAGGAAAAAAGGCATAGTCCAATGGCTTGCACCAACACGTGACTGGAAAT  
 \_L\_F\_E\_S\_F\_F\_P\_Y\_Q\_V\_T\_E\_R\_G\_C\_A\_L\_T\_F\_S

*PstI*

GCTTTGATTATCAGCCGAATCCGGAAGAAACCCCTGCTGCAGCAAAATGGCACCCCAAGAAG  
 901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 CGAAACTAATAGTCGGCTTAGGCCTTCTTTGGGACGACGTCGTTTTACCGTGGGTCTTC  
 \_F\_D\_Y\_Q\_P\_N\_P\_E\_E\_T\_L\_L\_Q\_Q\_N\_G\_T\_Q\_E\_E

*AgeI*

AAATCAAATGCATGGACCAGATCAAAAAAATCGAAACCACCGGTTGCAACCAAGAAATTA  
 961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+  
 TTTAGTTTACGTACCTGGTCTAGTTTTTTTAGCTTTGGTGGCCAACGTTGGTTCTTTAAT  
 \_I\_K\_C\_M\_D\_Q\_I\_K\_K\_I\_E\_T\_T\_G\_C\_N\_Q\_E\_I\_T

```

CCAGCTTTGAGATCAATCTGAAAGAGAAAAAATACCAAGAAGATTTCAACCCGCTGGTTC
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
GGTCGAAACTCTAGTTAGACTTTCTCTTTTTTATGGTTCTTCTAAAGTTGGGCGACCAAG
__S__F__E__I__N__L__K__E__K__Y__Q__E__D__F__N__P__L__V__R

                                                                 BstEII
GTGGTTGTAGCTGTTATTGTTGCAAAAATCATACCCGTGCCTATATTCATCATCTGCTGG
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
CACCAACATCGACAATAACAACGTTTTTAGTATGGGCACGGATATAAGTAGTAGACGACC
__G__C__S__C__Y__C__C__K__N__H__T__R__A__Y__I__H__H__L__L__V

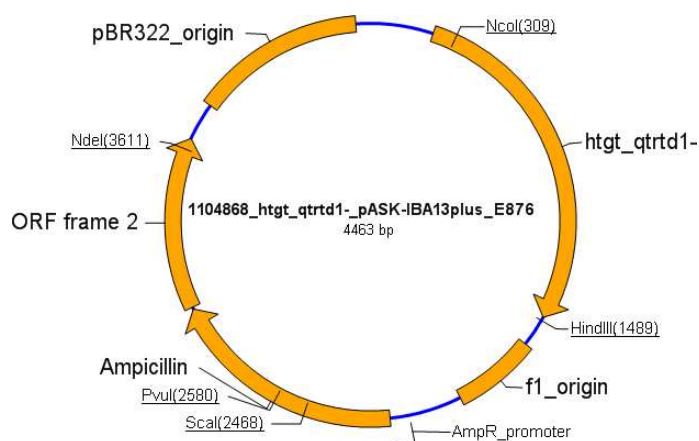
TTACCAATGAACTGCTGGCAGGCGTTCTGCTGATGATGCATAATTTTGAACATTATTTTG
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
AATGGTTACTTGACGACCGTCCGCAAGACGACTACTACGTATTAAAACTTGTAATAAAAC
__T__N__E__L__L__A__G__V__L__L__M__M__H__N__F__E__H__Y__F__G

                                                                 PvuII
GCTTTTTTTCATTATATCCGCGAGGCACTGAAAAGCGATAAACTGGCCCAGCTGAAAGAAC
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
CGAAAAAAGTAATATAGGCGCTCCGTGACTTTTCGCTATTTGACCGGGTCGACTTTCTTG
__F__F__H__Y__I__R__E__A__L__K__S__D__K__L__A__Q__L__K__E__L

                                                                 EcoRV      HindIII
TGATTCATCGTCAGGCAAGCTAAGATATCTAACTAAGCTTGACCTGTGAAGTGAAAAA
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACTAAGTAGCAGTCCGTTTCGATTCTATAGATTGATTGCGAACTGGACACTTCACTTTTT
__I__H__R__Q__A__S__*__

```

**Abbildung 80:** DNA- und Aminosäuresequenz der eukaryotischen QTRTD1 aus dem Menschen mit Restriktionsschnittstellen



**Abbildung 81:** Vektorkarte des Plasmid pASK-IBA13 plus\_hQ

### 3.5 Literaturverzeichnis

- **Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkóczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W.** (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr Sect D* 66: 213-221.
- **Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J.**(1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res*, **25**(17):p 3389-402.
- **Barandun, L. J., Immekus, F., Kohler P. C., Tonazzi, S., Wagner, B., Wendelspiess, S., Ritschel, T., Heine, A., Kansy, M., Klebe, G., Diederich F.,** (2012) From lin-benzoguanines to lin-benzohypoxanthines as ligands for *Zymomonas mobilis* tRNA-guanine transglycosylase: replacement of protein-ligand hydrogen bonding by importing water clusters. *Chemistry* **18** (30):9246-57
- **Baranowski, W., Dirheimer, G., Jakowicki, J.A.** (1994) Deficiency of queuine, a highly modified purine base, in transfer RNAs from primary and metastatic ovarian malignant tumors in women. *Cancer Res* **54**, 4468-4471
- **Brenk, R.** Virtuelles Screening, strukturbasiertes Design und Kristallstrukturanalyse von Inhibitoren der tRNA-Guanin Transglykosylase, ein Target der Bakterienruhr [Doktorarbeit], Philipps – Universität Marburg; 2002
- **Boland, C., Hayes, P., Santa-Maria, I., Nishimura, S., Kelly, V.P.,** (2009) Queuosine Formation in Eukaryotic tRNA occurs via a Mitochondria-localized Heteromeric Transglycosylase. *J Biol Chem*, **27**, 18218-18227
- **Bullock, W.O., Fernandez, J.M., Short, J.M.** (1987) *Biotechniques* **5**(4), 376-378
- **Bourdet-Sicard, R., Rudiger, M., Sansonetti, P.J., Tran Van Nhieu, G.** (1999) Vinculin is unfolded by the *Shigella* protein IpaA, and the complex promotes F-actin depolymerization. *EMBO J.* **18**, 5853-62
- **Chen, Y.-C., Kelly, V.P., Strachura, S.V., Garcia, G.A.** (2010), Characterization of the human tRNA-guanine transglycosylase: Confirmation of the heterodimeric subunit

structure, *RNA* (16) 5

- **Curnow, A.W., Kung, F.L., Koch, K.A., Garcia, G.A.** (1993) tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli*: gross tRNA structural requirements for recognition. *Biochemistry*, **32**(19), 5239-5246
- **Deshpande, K.L., Katze, L.R.** (2001) Charakterisation of cDNA encoding the human tRNA-guanin transglykosylasa (TGT) catalytic Subunit. *Gene*, **265**, 205-212
- **Diaz, I., Pedersen, S., Kurland, C.G.** (1987) Effects of *miaA* on translation and growth rates. *Mol Gen Genet.* **208**, 373-376
- **Dixon, M.** (1965) *Biochem. J.* **95**, 760-762
- **DuPont; H.L., Levine, M.M., Hornick, R.B., Formal, S.B.** (1998) Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmisson. *J. Infect. Dis.* **159**, 1126-1128
- **Durant, J.M., Okada, N., Tobe, T., Watarai, M., Fukuda, I., Suzuki, T., Nakata, N., Komatsu, K., Yoshikawa, M., Sasakawa, C.** (1994) *vacC*, a virulence-associated chromosomal locus of *Shigella flexneri*, is homologous to *tgt*, a gene encoding tRNA-guanine transglycosylase (TGT) of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* **176**, 4627-34
- **Durant, J.M., Bjork, G.R., Kuwae, A., Yoshikawa, M., Sasakawa, C.** (1997) The modified nucleoside 2-methylthio-N6-isopentenyladenosine in tRNA of *Shigella flexneri* is required for expression of virulence genes. *J Bacteriol.* **179**, 5777-82
- **Dorman, C.J., Porter, M.E.** (1998) The *Shigella* virulence gene regulatory cascade: a paradigm of bacterial gene control mechanisms. *Molecular Microbiology.* **29**, 677-684
- **Durant, J.M., Bjork, G.R.** (2003) Putrescine or a combination of methionine and arginine restores virulence gene expression in a tRNA modification-deficient mutant of *Shigella flexneri*: a possible role in adaptation of virulence. *Molecular Microbiology.* **47**, 519-527
- **Durant, J.M., Dagberg, B., Uhlin, B.E., Bjork, G.R.** (2000) Transfer RNA modification, temperature and DNA superhelicity have a common target in the regulatory network of the virulence of *Shigella flexneri*: the expression of the *virF* gene. *Molecular Microbiology.* **35**, 924-935
- **E Chayen, N., Saridakis, E.** (2008) Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal. *Nature Methods* (5) **2**, 147-153
- **Emmerich B., Zubrod E., Weber H., Maubach P. A., Kersten H., Kersten W.** (1985) Relationship of queuine-lacking transfer RNAs to the grade of malignancy in human leukemias and lymphomas. *Cancer Res* **45**, 4308-4314
- **Emsley, P., Cowtan, K.** (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr Sect D* **60**: 2126-2132
- **Evans, P.R.** (2011) An introduction to data reduction: space-group determination, scaling and intensity statistics. *Acta Crystallogr Sect D* **67**: 282-292.
- **Grädler, U., Gerber, H.D., Goodenougt-Lashuna, D.M., Gracia, G.A., Ficner, R., Reuter. K., Stubbs, M.T., Klebe. G.** (2001) A New Target for Shigellosis: Rational Design and Crystallgraphic Studies of Inhibitors of tRNA-guanine Transglycosylase. *J*

*Mol Biol.* **306**, 455-467

- **Greener, A., Jerpseth, B.** (1993) *Strategies* **6(2)**, 57
- **Huang and Miller**, published in *Adv. Appl. Math.* (1991) 12:337-357.
- **Iwata-Reuyl, D.**, (2003) Biosynthesis of the 7-deazoguanosine hypermodified nucleosides of transfer RNS. *Bioorg Chem.* **31**, 24-43
- **Jennison, A.V., Naresh, K.V.** (2004) *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**, 43-58
- **Jerpseth, B., Callahan, M., Greener, A.**(1997) *Strategies* **10(2)**, 37-38
- **Jerpseth, M., Jerpseth, B., Briester, L., Greener, A.** (1998) *Strategies* **11(1)**, 3-4
- **Kadurugamuwa, J.L., Rhode. M., Wehland, J., Timmis, K.N.** (1991) Intercellular spread of *Shigella flexneri* through a monolayer mediated by membranous protrusions and associated with reorganisation of the cytoskeletal protein vinculin. *Infect. Immun.* **59**, 3463-3471
- **Kleywegt, G.J., Zou, J.Y., Kjeldgaard, M. & Jones, T.A.** (2001). Around O. In: "International Tables for Crystallography, Vol. F. Crystallography of Biological Macromolecules" (Rossmann, M.G. & Arnold, E., Editors). Chapter 17.1, pp. 353-356, 366-367. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- **Krissinel, E. and Henrick, K** (2007). *Inference of macromolecular assemblies from crystalline state.* *J. Mol. Biol.* **372**, 774--797
- **Krug, M., Weiss, M.S., Mueller, U., Heinemann, U.**, (2012). *J. Appl. Cryst.* **45**, 568-572
- **Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., Thornton, J.M.** (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr* **26**: 283-291.
- **Leatherbarrow R.** (USA 1999) GraFit 4.09 edit. Erithacus Software Limited
- **Lorber, B., Sauter, C., Théobald-Dietrich, A., Moreno, A., Schellenberger, P., Robert M.C., Capella, B., Sanglier, S., Potier, A., Giegé, R.**, (2009) Crystal grow of protein, nucleic acids, and viruses in gels. *Proq Biophys Mol Bio* **101(1-3)**: 13-25
- **Marks, T., Farkas, W.R.**, (1997), Effects of a diet deficient in tyrosine and queueine on germfree mice. *Biochem Biophys Res Commun* **230**, 233-237
- **McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R., Adams, P.D., Winn, M.D., Storoni, L.C., Storoni, R.J.** (2007), Phaser Crystallographic Software. *Journal of Applied Crystallography* **40**:p. 658-674
- **Meyer E. A., Donati N., Guillot M., Schweizer W. B., Diederich F., Stengl B., Brenk R., Reuter K., Klebe G.** (2006) Synthesis, biological evaluation, and crystallographic studies of extended guanine base (lin-Benzoguanine) inhibitors for tRNA-guanine transglycosylase (TGT). *Helv. Chim. Acta.* **89** (4), 573 -597
- **Nelson, D. and Cox, M.** (2001) Lehninger Biochemie Vol. 3. *Berlin Heidelberg: Springer Verlag.*
- **Niesen, F.H., Berglund, H. and Vedadi, M.** (2007) The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature Protocols* **2**, 2212-2221.
- **Noguchi, S., Nishimura, Y., Hirota, Y., Nishimura, S.** (1982) Isolation and

characterization of an Escherichia coli mutant lacking tRNA-guanine transglycosylase. Function and biosynthesis of queuosine in tRNA. *J Biol Chem.* **257**, 6544-6550

- **Novy, R., Drott, D., Yaeger, K., Mierendorf, R.** (2001) *in* *Novations* **12**, 1-3
- **Proteau, A., Shi, R., Cygler, M.,** (2010) Application of Dynamic Light Scattering in Protein Crystallization. *Structural Biology* 17.10.1-17.10.9
- **Pape, T. & Schneider T.R.** (2004) HKL2MAP: a graphical user interface for phasing with SHELX programs. *J. Appl. Cryst.* **37**:843-844
- **Parsot, C., Ageron, E., Penno, C., Mavris, M., Jamoussi, K., d'Hauteville, H., Sansonetti, P.J., Demers, B.** (2005) A secreted anti-activator, OspD1, and its Chaperon, Spa15, are involved in the control of transcription by the type III secretion apparatus activity in *Shigella flexneri*. *Molecular Microbiology.* **56**, 1627-35
- **Pathak C., Vinayak M.** (2005) Modulation of lactate dehydrogenase isozymes by modified base queuine. *Mol Biol Rep* **32**, 191-196
- **Purdy, G.E., Homg, M., Payne, S.M.** (2002) *Shigella flexneri* DegP facilitates IscA surface expression and is required for efficient intercellular spread. *Infect. Immun.* **70**, 6355-6364
- **Reardon, D. & Farber, G. K.** (1995). The structure and evolution of alpha/beta barrel proteins. *FASEB J* **9**(7), 497-503
- **Reyniers, J.P., Pleasants, J.R., Wostmann, B.S., Katze, J.R., Farkas, W.R.** (1981) Administration of exogenous queuine is essential for the biosynthesis of the queosine-containing transfer RNAs in the mouse. *J Biol Chem* **206**, 11591-11594
- **Ritschel, T.,** (2009). TGT a Drug Target to Study pKa shifts, Residual Solvation & Protein-Protein Interface Formation
- **Ritschel, T., Kohler, P. C., Neudert, G., Heine, A., Diederich, F., Klebe, G.** (2009) How to replace the residual solvation shell of polar active site residues to achieve nanomolar inhibition of tRNA-guanine transglycosylase. *ChemMedChem.* Dec; **4**(12): 2012-23
- **Ritschel, T., Atmanene, C., Reuter, K., Van Dorsselaer, A., Sanglier-Cianferani, S., et al.** (2009) An integrative approach combining noncovalent mass spectrometry, enzyme kinetics and X-ray crystallography to decipher Tgt protein-protein and protein-RNA interaction. *J Mol Biol* **393**, 833-847
- **Romier, C., Reuter, K., Suck, D., Fisner, R.** (1996b) Crystal structure of tRNA guanine transglycosylase: RNA modification by base exchange. *Embo J*, **15**, 2850-2857
- **Romier, C., Meyer, J.E. & Suck, D.** (1997) Slight sequence variations of a common fold explain the substrate specificities of tRNA-guanine transglycosylase from the three kingdoms. *FEBS Lett* **416**(1), 93-8
- **Romier, C., Fisner, R., Suck, D.** (1998) Struktural Basis of Base Exchange by tRNA Guanine Transglycosylase. In Grosjean, H. Benne, R., editors, *Modification and editing of RNA*, Seiten 169-182. ASM Press, Washington, D.C.
- **Sambrook, T., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning. A Laboratory Manuel.* Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York, 2. Auflage.

- **Sansonetti P.J.** (1991) Genetic and molecular basis of epithelial cell invasion by Shigella species. *Rev. Infect. Dis.* **13**, 285-292
- **Sansonetti P.J.** (2001) Microbes and Microbial Toxins: Paradigms for Microbial-Mucosal Interaction III. Shigellosis: from symptoms to molecular pathogenesis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **280**, 319-323
- **Schrödinger** The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, LLC
- **Stengl B.** Structural and Functional Studies of tRNA-Guanin Transglycosylase: A putative Drug Target of Shigellosis Therapie [Doktorarbeit], Philipps – Universität Marburg; 2006
- **Stengl, B., Reuter. K., Klebe. G.** (2005) Mechanism and Substrate Specificity of tRNA-Guanine Transglycosylases (TGTs): tRNA-Modifying Enzymes from the Three Different Kingdoms of Life Share a Common Catalytic Mechanism. *ChemBioChem.* **6**, 1-15
- **Studier, F.W., Moffatt, B.A.** (1986) Use of bacteriophage t7RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J.Biol.Chem.* **189(1)**, 113-130
- **Terwilinger, T.C., Grosse-Kunstleve, R.W., Afonine, P.V., Moriarty, N.W., Twart, P.H., Hung, L.-W., Read, R.J., Adams, P.D.** (2008) Iterative model building, structure refinement and density modification with the PHENIX AutoBuild wizard. *Acta Cryst D64*, 61-69
- **The UniProt Consortium** (2011) Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.* **40**: D71-D75
- **Tidten N.** Structural and mutational characterisation of Shigella Pathogenicity Factors [Doktorarbeit], Philipps – Universität Marburg; 2007
- **Watanabe, M., Matsuo, M., Tanaka, S., Akimoto, H., Asahi, S., Nishimura, S., Katze, J.R., Hashizume, T., Crain, P.F., McCloskey, J.A., Okada, N.** (1997) Biosynthesis of archaeosine, a novel derivative of 7-deazguanosine specific to archaeal tRNA, proceeds via a pathway involving base replacement on the tRNA polynucleotide chain. *J Biol Chem.* **272**, 20146-51
- **Weiner, M.P., Anderson, C., Jerpseth, B., Wells, S., Johnson-Browne, B.** (1994) *Strategies* **7(2)**, 41-43
- **Wienken CJ, Baaske P, Rothbauer U, Braun D, Duhr S** (2010) Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nat Commun* **1**: 100.
- **Zychlinsky A., Sansonetti P.J.** (1997) Apoptosis are a pro-inflammatory event: what can we learn from bacteria-induced cell death? *Trends Microbiol.* **5**, 201-204
- **WHO**, 2005

## 4 Zusammenfassung

Die bakterielle tRNA-Guanin-Transglycosylase (TGT) katalysiert den Austausch des genetisch kodierten Guanins in der "Wobble"-Position der tRNAs<sup>His,Tyr,Asp,Asn</sup> gegen die prämodifizierte Base preQ<sub>1</sub>, welche dann auf der tRNA-Ebene weiter in die vollständig modifizierte Base Queuin überführt wird. Da das Enzym für die Pathogenität von Shigellen, den Erregern der Bakterienruhr, essentiell ist, stellt es ein attraktives Zielmolekül für das computergestützte Design von Wirkstoffen gegen die Shigellose dar. Jedoch verfügen auch Eukaryoten und somit der Mensch über eine TGT. Im Gegensatz zur homodimeren prokaryotischen TGT stellt die eukaryotische TGT ein Heterodimer aus einer katalytischen und einer nicht-katalytischen Untereinheit dar, wobei beide Untereinheiten Homologie zum Protomer des bakteriellen Enzyms aufweisen. Darüber hinaus ist das physiologische Substrat der eukaryotischen TGT nicht preQ<sub>1</sub> sondern die vollmodifizierte Base Queuin, denn Eukaryoten sind nicht in der Lage, Queuin de novo zu synthetisieren. Vielmehr erhalten sie diese Base über die Nahrung und über die Darmflora. Da am Mausmodell gezeigt wurde, dass die TGT indirekt für die Umwandlung von Phenylalanin zu Tyrosin erforderlich ist, scheint es dringend geboten, Inhibitoren zu entwickeln, die die bakterielle, nicht jedoch die eukaryotische TGT hemmen. Andernfalls dürfte mit Nebenwirkungen zu rechnen sein, die dem Krankheitsbild der Phenylketonurie ähneln. Es scheint einleuchtend, dass eine möglichst genaue Kenntnis der Unterschiede zwischen dem prokaryotischen und dem eukaryotischen Enzym eine Voraussetzung für die Entwicklung bakterienspezifischer TGT-Inhibitoren ist.

Obwohl noch keine Kristallstruktur einer eukaryotischen TGT bestimmt wurde, deuten Homologiemodelle der TGT aus *Caenorhabditis elegans* und aus dem Menschen darauf hin, dass der Austausch von Cys158 und Val233 in der bakteriellen TGT (Z. mobilis TGT-Nummerierung) durch Valin bzw. Glycin in der eukaryotischen TGT einen wichtigen Einfluss auf die Substratspezifität hat. So wurden im ersten Teil der vorliegenden Arbeit mutierte Varianten der bakteriellen TGT erzeugt, um die Auswirkungen eines Cys158Val- und eines Val233Gly-Austausches auf die katalytische Aktivität und Substratspezifität zu analysieren. Die Untersuchung der Varianten erfolgte durch Bestimmung ihrer enzymkinetischen Parameter, durch "Microscale-Thermophoresis", durch Gelshift-Analysen und schließlich durch Röntgenstrukturanalyse. Obwohl es im Rahmen dieser Studie nicht gelang, eine bakterielle TGT-Variante zu erzeugen, die in der Lage ist, Queuin in die tRNA einzubauen, zeigen die Ergebnisse, dass der Austausch von Cys158 zu Valin eine herabgesetzte Affinität des Enzyms zu preQ<sub>1</sub>, dem natürlichen Substrat des bakteriellen Enzyms, zur Folge hat. Der Austausch von Val233 zu Glycin führt dagegen zu einer signifikanten Vergrößerung der Substratbindetasche, welche erforderlich ist, um Queuin, das Substrat der eukaryotischen TGT, in einer Konformation zu binden,



die mit der intermediär kovalent gebundenen tRNA kompatibel ist. Ein unerwartetes Ergebnis der Studie ist, dass Queuin a priori in die Bindetasche der prokaryotischen TGT binden kann, ohne jedoch als Substrat umgesetzt zu werden.

Ziel des zweiten Teils der Dissertation war die biochemische Charakterisierung der eukaryotischen TGT sowie die Durchführung von Kristallisationsversuchen als Voraussetzung für eine Röntgenstrukturanalyse. Zu diesem Zweck wurden zunächst Expressionsplasmide konstruiert, die die effiziente rekombinante Produktion der beiden TGT-Untereinheiten aus der Maus sowie aus dem Menschen in *Escherichia coli* ermöglichen sollten. Die (separate) Produktion und Reinigung der katalytischen Untereinheit (QTRT1) sowie der nicht-katalytischen Untereinheit (QTRTD1v1) der Maus-TGT erfolgte mit zufriedenstellenden Ausbeuten von jeweils ca. 4 mg pro Liter Bakterienkultur. Dagegen gelang die Reinigung der rekombinanten menschlichen TGT-Untereinheiten nur in unzureichendem Umfang (jeweils < 0,4 mg pro Liter Bakterienkultur), sodass die biochemischen Untersuchungen sowie Kristallisationsversuche weitgehend auf das Maus-Enzym beschränkt blieben. Enzymkinetische Untersuchungen bestätigten frühere Befunde von anderen Arbeitsgruppen, die gezeigt hatten, dass ausschließlich das QTRT1/QTRTD1v1-Heterodimer Enzymaktivität zeigt, während die separaten Untereinheiten völlig inaktiv sind. Darüber hinaus wurde durch NanoESI-MS-Experimente die heterodimere Quartärstruktur der eukaryotischen TGT bestätigt und gezeigt, dass pro Heterodimer gleichzeitig nur ein tRNA-Substrat gebunden und umgesetzt werden kann. Ein weiterer durch NanoESI-MS erhaltener Befund war, dass die katalytische QTRT1-Untereinheit in Abwesenheit des Interaktionspartners in Lösung als Monomer vorliegt, wogegen die nicht-katalytische QTRTD1v1-Untereinheit zumindest in höherer Konzentration ein Homodimer ausbildet. Thermal Shift-Messungen zeigten schließlich, dass sowohl QTRT1 als auch QTRTD1v1 in Hochsalzpuffer (1000 mM NaCl) eine deutlich höhere Stabilität aufweisen als unter Niedrigsalzbedingungen. Kristallisationsversuche, die mit beiden Untereinheiten sowie mit der heterodimeren TGT durchgeführt wurden, lieferten im Fall der nicht-katalytischen QTRTD1v1 reproduzierbare Kristalle, die bei Anwendung von hochfokussierter Synchrotronstrahlung ein Streuvermögen von ca. 2,8 Å zeigten. Von dieser Kristallform wurde an der Beamline 14.1 des BESSY II (Helmholtz-Zentrum, Berlin) ein Datensatz aufgenommen, der die Strukturaufklärung mit der Methode des Molekularen Ersatzes erlaubte. Als Modellkoordinaten dienten dabei die Koordinaten der TGT aus dem Bakterium *Thermotoga maritima* (PDB-Code 2ASH). Die verfeinerte QTRTD1v1-Struktur zeigt, dass das Protein im Kristall als Homodimer vorliegt, das dem Homodimer der bakteriellen TGT in seinem Aufbau frappierend ähnelt.

Voraussetzung für das Design von Inhibitoren, welche spezifisch die bakterielle, nicht jedoch die menschliche TGT inhibieren, ist ein detailliertes biochemisches und strukturelles Verständnis des eukaryotischen Enzyms. Durch die hier erfolgte rekombinante Produktion und Reinigung beider

eukaryotischer TGT-Untereinheiten sowie durch die Bestimmung einer ersten Kristallstruktur wurde eine wichtige Grundlage für dieses Ziel geschaffen.

## Summary

Bacterial tRNA-guanine transglycosylase (TGT) catalyses the exchange of the genetically encoded guanine at the wobble position of tRNAs<sup>His,Tyr,Asp,Asn</sup> by the premodified base preQ<sub>1</sub>, which is further converted to the fully modified queuine base at the tRNA level. As this enzyme is essential for the pathogenicity of *Shigellae*, the causative agents of bacterial dysentery, it represents an attractive target for the rational design of anti-Shigellosis compounds. However, also eucaryotes and, therefore, humans possess a TGT. In contrast to the homodimeric procaryotic TGT the eucaryotic enzyme constitutes a heterodimer consisting of a catalytic and a non-catalytic subunit, with both subunits, however, being homologous to the bacterial protomer. In addition, the physiological substrate of the eucaryotic TGT is not preQ<sub>1</sub> but the fully modified queuine, since eucaryotes are not able to synthesise queuine de novo. Rather, they acquire this base from their diet or from the gut flora. As in a mouse model eucaryotic TGT was shown to be indirectly required for the conversion of phenylalanine to tyrosine, it seems of utmost importance to create compounds inhibiting the procaryotic but not the eucaryotic enzyme. Elsewise, phenylketonurea-like secondary effects have to be expected. Obviously, a detailed knowledge about the differences between procaryotic and eucaryotic TGT is a precondition to design specific inhibitors of the bacterial enzyme.

Although no crystal structure of a eucaryotic TGT has been determined yet, homology models of the *Caenorhabditis elegans* and the human TGT suggest that the exchange of Cys158 and Val233 in bacterial TGT (*Z. mobilis* TGT numbering) by valine or rather glycine in eucaryotic TGT have a large impact on substrate specificity. Accordingly, in the first part of this work, mutated variants of bacterial TGT were generated in order to investigate the influence of a Cys158Val and a Val233Cys exchange on catalytic activity and substrate specificity. The analysis of the mutated variants was carried out via determination of their enzyme kinetic parameters, via "microscale thermophoresis", via a gel shift experiment and, lastly, via crystal structure analyses. The results show that the exchange of Cys158 to valine results in a decreased affinity of the enzyme to the physiological substrate of the bacterial enzyme, preQ<sub>1</sub>. In contrast, the exchange of Val233 to glycine leads to an enlarged substrate binding pocket which is required to accommodate queuine, the physiological substrate of the eucaryotic TGT, in a conformation compatible with the intermediately covalently

bound tRNA. Contrary to our expectations, we found that a priori queuine is recognised by the binding pocket of bacterial Tgt without, however, being used as a substrate.

The goal of the second part of this thesis was the biochemical characterisation of the eucaryotic TGT as well as the attempt to crystallise this enzyme as a basic prerequisite for crystal structure determination. For this purpose, expression plasmids were constructed allowing the recombinant production of the murine and human TGT subunits in *Escherichia coli*. The (separate) production and purification of the murine catalytical subunit (mQTRT1) and of the non-catalytical subunit (mQTRTD1v1) resulted in satisfying yields of ca. 4 mg per Liter of bacterial culture, each. In contrast, the purification of the recombinant human TGT subunits was significantly less successful (in each case < 0.4 mg per Liter of bacterial culture), so that the biochemical analysis as well as crystallisation trials remained largely confined to the murine enzyme.

NanoESI-MS experiments confirmed the heterodimeric quaternary structure of the eucaryotic TGT and showed that, simultaneously, only one tRNA molecule can be accommodated and converted by one heterodimer. Another finding gained by nano-ESI-MS was that the catalytic QTRT1 subunit is, in the absence of its interaction partner, present as a monomer in solution. In contrast, the non-catalytic QTRTD1v1 subunit tends to form a homodimer in the absence of QTRT1. Enzyme kinetic analyses confirmed former reports of other research groups who had shown that solely the QTRT1/QTRTD1v1 heterodimer is enzymatically active, while the separate subunits are not. Thermal shift measurements finally showed that both QTRT1 and QTRTD1v1 are much more stable under high salt conditions (1000 mM NaCl) than under low salt conditions. Crystallisation trials performed with the two subunits as well as with the heterodimeric functional enzyme yielded, in the case of QTRTD1v1, reproducible crystals. When exposed to highly focussed synchrotron radiation, these crystals diffracted to ca. 2.8 Å. A data set recorded at beamline 14.1 of BESSY II (Helmholtz center, Berlin) allowed the structure determination via molecular replacement using the coordinates of *Thermotoga maritima* TGT (pdb code: 2ASH) as model coordinates. The refined QTRTD1v1 structure reveals that, within the crystal, the protein is present as a homodimer whose architecture strikingly resembles the homodimer of bacterial TGT.

A detailed biochemical and structural knowledge of the eucaryotic TGT is a basic requirement for the design of inhibitors which specifically inhibit the bacterial TGT while leaving the eucaryotic enzyme unaffected. The recombinant production and purification of both subunits of a eucaryotic TGT as well as the determination of a first crystal structure which were achieved in the present work constitute an important basis for this goal.

## Publikationen

### Poster

Florian Immekus, Stephan Jakobi, Inna Schmidt, Gerhard Klebe, *P7: Perturbance of enzyme function by blocking dimer interface formation: novel route to specific antibiotics*, FG 806, 2010: Berlin, Germany

Inna Schmidt, Klaus Reuter, Gerhard Klebe, *Expression and purification of the eukaryotic TGT and Q\_v1 from Mus musculus & characterization of this heterodimer complex*, 5<sup>th</sup> Summer School "Medicinal Chemistry", 2010: Regensburg, Germany

Inna Schmidt, Klaus Reuter, Gerhard Klebe, *Characterization of the eukaryotic TGT, Qv1 and of the corresponding heterodimer complex from Mus musculus*, DiPIA, 2011: Boston, USA

### Veröffentlichungen

Inna Biela, Naomi Tidten-Luksch, Florian Immekus, Serghei Glinca, Tran Xuan Phong Nguyen, Hans-Dieter Gerber, Andreas Heine, Gerhard Klebe, Klaus Reuter (2013), *Investigation of Specificity Determinants in Bacterial tRNA-Guanine Transglycosylase Reveals Queuine, the Substrate of its Eucaryotic Counterpart, as Inhibitor. Substrate Specificity in tRNA-Guanine Transglycosylase*, Plos one **8**: e64240.

## Danksagung

„Keine Schuld ist dringender, als die, Dank zu sagen.“

Marcus Tullius Cicero (106-43), röm. Redner u. Schriftsteller

Natürlich möchte ich mich für die Unterstützung während der Promotionszeit bei einigen Menschen besonders bedanken.

**Prof. Dr. Gerhard Klebe** danke ich für das interessante Thema, insbesondere für die Freiheit in der Gestaltung meiner Arbeit und nicht zu vergessen für seine großzügige finanzielle Förderung der Laborausstattung und der zahlreicher Tagungsreisen. Ich danke Ihm besonders für seinen fairen und menschlichen Umgang mit seinen Doktoranden, was Ihn für mich zum Vorbild macht.

**Prof. Dr. Klaus Reuter** danke ich für die Betreuung meiner Arbeit, die vielen Gespräche und Diskussionen bei Problemen und für seine großzügige Hilfsbereitschaft.

**Dr. Andreas Heine** danke ich für die Einführung in die kristallographischen Methoden und für die Unterstützung bei der Sammlung und Auswertung röntgenkristallographischen Daten.

**Christian Sohn** danke ich für die stetige Instandhaltung des Röntgendiffraktrometers und seine offenerzige Art.

**Dr. Holger Steuber** danke ich besonders für die Sammlung des Datensatz der mQv1 und für die motivierende Unterstützung bei der Strukturlösung. Die Zusammenarbeit mit ihm hat mir sehr viel Spaß gemacht und war nichtsdestotrotz stets produktiv.

**Synmikro** insbesondere **Ralf Pöschke**, **Petra Gnau** und **Dr. Holger Steuber** danke ich für die Unterstützung bei der Arbeit am Kristallisationsroboter.

**Dr. Sarah Cianferani-Sangler** und **Stéphanie Petiot-Bécard** vom Labor der Massenspektrometrie für biologische Chemie in Straßburg - IPHC-DSA-LSMBO- danke ich für die Durchführung und Auswertung der ESI-MS Experimente unter nativen Bedingungen.

Dem **Massenspektrometrieteam** unter der Leiter von **Dr. Uwe Linne** an der Philipps-Universität Marburg / Fachbereich 15 danke ich für die Durchführung HPLC-MS Experimente zur Bestimmung der exakten Proteinmasse.

**Dr. Stephane Boivin** am EMBL in Hamburg danke ich für die Durchführung der Thermal Shift Messungen.

**Dr. Arne Meyer** und **Dr. Markus Perbandt** aus der Arbeitsgruppe von Prof. Betzel (Universität Hamburg) danke ich für die Bereitstellung des Geräts Spectro Size 300 und für die Betreuung bei der Durchführung der DLS Experimenten.

**Lydia Hartleben** danke ich für ihre stetige Hilfe in organisatorischen Angelegenheiten.

**Sven Siebler**, **Gerd Neudert**, **Denis Schmidt**, **Serghei Glinca**, **Michael Betz**, **Timo Krotzky** und **Felix Gut** danke ich für ihre Hilfsbereitschaft in administratorischen Angelegenheiten und Notfälle.

Ich danke der gesamten **AG Klebe** für eine tolle Arbeitsatmosphäre.

Besonders möchte ich mich bei **Barbara Wienen, Ina Lindemann, Helene Köster, Stephan Jakobi, Maren Jakobi, Denis Schmidt** und **Manuel Neeb** für eine schöne Zeit in Marburg und ihre Freundschaft bedanken. Mit euch zusammen habe ich viel gelacht, mich immer sehr wohl gefühlt und die Zeit sehr genossen.

Ganz besonders danken möchte ich meiner Familie. Meinen Eltern **Irina** und **Alexander Schmidt** danke ich für ihre Fürsorge und immerwährende Unterstützung in jeder Lebenslage. Ihr habt viel auf euch genommen um mir dieses Leben mit diesen vielen schönen Privilegien zu ermöglichen, dafür danke ich euch aus tiefsten Herzen. Meiner Oma **Tatjana Zwicker** danke ich für ihre Bemühung um mein Wohl und ihren großen Lebensschatz. Mein Bruder **Oleg Schmidt** danke für die anregenden Diskussionen über die Wissenschaft, Gott und die Welt.

Schließlich möchte ich mich bei meinem Mann **Adam Biela** bedanken. Seine tiefe Verbundenheit hat mir immer wieder Kraft, Ideen und Energie für meine Arbeit gespendet. Du hast mich immer in jeder Lebenslage unterstützt und stets an mich geglaubt, dafür danke dir aus tiefsten Herzen.

## Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**„Untersuchung der Substratspezifität der tRNA-Guanin-Transglycosylase (TGT) aus Eukaryoten und Prokaryoten und Charakterisierung der eukaryotischen TGT“**

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quelle bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient

Marburg, den 04.12.2013

-----  
Inna Biela